



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical



**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PARVOVÍRUS EM AMOSTRAS FECAIS
DE PRIMATAS NÃO HUMANOS EM CATIVEIRO**

Mariana da Conceição Carrusca

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências Biomédicas, especialidade em
Biologia Molecular em Saúde Tropical e Internacional

Janeiro, 2017



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical



**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PARVOVÍRUS EM AMOSTRAS FECAIS
DE PRIMATAS NÃO HUMANOS EM CATIVEIRO**

Mariana da Conceição Carrusca

Orientadora: Professora Doutora Aida Esteves Simões

Co-orientador: Professor Doutor João Piedade

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, Especialidade em Biologia Molecular em Saúde Tropical e Internacional

Trabalho experimental desenvolvido no laboratório do Grupo de Virologia, Unidade de Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

Agradecimentos

A presente dissertação de mestrado não poderia ter sido concretizada sem o precioso apoio de várias pessoas.

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Aida Esteves, por toda a orientação, apoio e conhecimento que partilhou comigo. Muito obrigada por me corrigir sempre que necessário sem nunca me desencorajar, pela sua paciência, entusiasmo e dedicação.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor João Piedade, pela preciosa ajuda e partilha de conhecimentos. A sua paciência e rigor, bem como a sua boa disposição e incentivo foram fundamentais na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Ricardo Parreira, pela disponibilidade sempre que a sua ajuda foi necessária e pelas valiosas aulas de bioinformática.

A todos os elementos do Grupo de Virologia pela simpatia com que me receberam, em particular à técnica Ângela Mendes pelas suas palavras de incentivo e constante disponibilidade para ajudar.

Ao Dr. Rui Bernardino, Dr. Teresa Lobo Fernandes, Dr. Narciso Lapão e restante equipa, pelas amostras de primatas não humanos e de pequenos mamíferos do Jardim Zoológico de Lisboa.

Ao Doutor Alexandre Leitão, Dr. Denis Medinas, Vera Ribeiro e Doutor António Mira pela disponibilização das amostras fecais de morcego.

À Mestre Nicole Lourenço pela disponibilização da base de dados dos primatas.

Às minhas colegas de mestrado, pela companhia durante os dias de trabalho, pelo incentivo e pelos momentos de descontração.

A toda a minha família e amigos, pela paciência, compreensão e pelo apoio absoluto.

Resumo

Os parvovírus são pequenos vírus com genoma de DNA de cadeia simples linear (~5 kb), simetria icosaédrica, sem invólucro, membros da família *Parvoviridae*. Os membros da subfamília *Parvovirinae* infectam vertebrados e causam desde infecções assintomáticas até um largo espectro de doenças agudas e crónicas. Desde 2005, os parvovírus 4 (PARV4, género *Tetraparvovirus*), bocavírus (BoV, género *Bocaparvovirus*) e bufavírus (BuV, género *Protoparvovirus*) foram detectados em amostras fecais humanas e num número reduzido de símios. O conhecimento sobre associação a doença, origem e evolução destes parvovírus de primatas é muito limitado.

O objectivo deste estudo consistiu em detectar e caracterizar parvovírus PARV4, BoV e BuV em amostras fecais de primatas não humanos em cativeiro no Jardim Zoológico de Lisboa. Com esse intuito, 128 amostras fecais de grandes símios, gibões, macacos do Velho Mundo, macacos do Novo Mundo e lémures foram testadas para a presença de DNA de parvovírus por PCR com *primers* degenerados, específicos de género, tendo como alvo um fragmento do gene NS1 de parvovírus, e sequenciados os amplicões obtidos.

Detectou-se DNA genómico de BoV em 5,5% (7/128) das amostras fecais, todas provenientes de chimpanzé-comum, enquanto a presença de DNA de BuV foi demonstrada em 14,8% (19/128). As últimas eram originárias de chimpanzé-comum (8/10), gibão-de-mãos-brancas (2/4) e macacos do Velho Mundo, nomeadamente macaco-do-japão (1/10), macaco-cauda-de-leão (5/5), macaco-de-nariz-branco (2/4) e macaco-diana (1/2). Não foi detectado DNA de vírus semelhantes a PARV4 nas amostras fecais analisadas.

As novas sequências de BoV aqui descritas, provenientes exclusivamente de chimpanzé-comum, revelaram uma grande homogeneidade genética e, baseado na análise filogenética, uma relação estreita com duas outras sequências de BoV de chimpanzé e BoV3 humano. Para além do chimpanzé-comum, o gorila é o outro hospedeiro primata não humano onde foram identificados BoV o que, conjuntamente com estes resultados, sugere que os grandes símios sejam hospedeiros naturais destes vírus. As sequências de BuV, de um modo geral, surgem nas árvores filogenéticas segregadas de acordo com o grupo taxonómico do hospedeiro de onde derivam, sendo possível observar grupos monofiléticos que incluem i) BuV humanos e de chimpanzé-comum, ii) BuV de macacos do Velho Mundo e iii) BuV de gibões. De salientar que se trata da primeira descrição da detecção de BuV para qualquer uma das espécies acima mencionadas. É também de realçar que é a primeira vez que os parvovírus são identificados em primatas da família *Hylobatidae* e, considerando o seu posicionamento na árvore filogenética e distanciamento dos outros bufavírus, é possível que no futuro estes vírus venham a constituir uma nova espécie viral dentro do género *Protoparvovirus*. A sequenciação do genoma completo dos novos parvovírus descritos será fundamental para elucidar a sua origem e evolução, nomeadamente a ocorrência de potenciais eventos de recombinação. Conseguiu-se ainda demonstrar a replicação de BuV de chimpanzé numa linha celular humana, facto que permitirá estabelecer um modelo de replicação *in vitro* destes vírus.

Palavras chave: Primatas não humanos, parvovírus PARV4, bocavírus, bufavírus.

Abstract

Parvoviruses are small non-enveloped icosahedral viruses with a linear single-stranded DNA genome (~5kb) in the *Parvoviridae* family. Members of the *Parvovirinae* subfamily infect vertebrates and cause from asymptomatic infections to a large spectrum of acute and chronic diseases. Since 2005, parvovirus 4 (PARV4, *Tetraparvovirus* genus), bocavirus (BoV, *Bocaparvovirus* genus), and bufavirus (BuV, *Protoparvovirus* genus) were identified in fecal samples from humans and a small number of nonhuman primates. Correlates of disease, origin and evolution of these primate parvoviruses are limited.

The objective of this study was to detect and to characterize parvoviruses PARV4, BoV, and BuV in fecal samples of nonhuman primates in captivity in the Lisbon's Zoo. With this aim, 128 fecal samples from great apes, gibbons, Old World monkeys, New World monkeys, and lemurs were screened for the presence of parvovirus DNA by PCR using genus-specific, degenerated primers targeting part of the NS1 gene and the amplicons sequenced for analysis.

BoV DNA was detected in 5.5% (7/128) of the fecal samples, all obtained from chimpanzees, while BuV DNA sequences were demonstrated in 14.8% (19/128). The latter were collected from chimpanzees (8/10), white-handed gibbons (2/4), and Old World monkeys, namely Japanese macaque (1/10), lion-tailed macaque (5/5), red-tailed monkey (2/4), and Diana monkey (1/2). Genomic DNA from PARV4-like viruses was not identified in the analyzed fecal samples.

The new chimpanzee BoV nucleotide sequences described herein demonstrated high genetic homogeneity and, based on phylogenetic analysis, showed a close relationship to two other chimpanzee BoV and human BoV3. Besides the chimpanzees, the gorilla is the other nonhuman primate host where BoV was identified which, together with these results, suggests that great apes are natural hosts of these viruses. Generally, the BuV sequences segregated in phylogenetic trees according to the host taxonomic group they were derived from, being possible to observe monophyletic groups consisting on i) chimpanzee and human BuV, ii) Old World monkey BuV, and iii) gibbon BuV. It is noteworthy that this is the first description of BuV detection for any of the aforementioned simian species. It should also be noted that it is the first time that parvoviruses are identified in primates from the *Hylobatidae* family and, considering their position in the phylogenetic tree and distance from other bufaviruses, it is possible that in the future these viruses might originate a new viral species within the *Protoparvovirus* genus. Full-length genome sequencing is required to clarify the origin and evolution of the parvoviruses identified, particularly the occurrence of recombination events. It has also been demonstrated the replication of chimpanzee BuV in a human cell line, making feasible the establishment of an *in vitro* replication model of these viruses.

Key words: Nonhuman primates, parvovirus PARV4, bocavirus, bufavirus.

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	História	2
1.2.	Estrutura do virião e organização do genoma	4
1.2.1.	Estrutura do virião	4
1.2.2.	Estrutura e organização do genoma	5
1.3.	Proteínas virais	9
1.4.	Ciclo replicativo	12
1.4.1.	Entrada na célula	12
1.4.2.	Transporte nuclear	13
1.4.3.	Síntese do DNA genômico viral e expressão dos genes virais	14
1.4.4.	Montagem e saída dos novos viriões	15
1.5.	Classificação e diversidade genética	17
1.5.1.	Classificação	17
1.5.2.	Diversidade genética e evolução	18
1.6.	Epidemiologia dos parvovírus de transmissão fecal-oral	24
1.6.1.	PARV4	24
1.6.2.	BoV	25
1.6.3.	BuV	26
1.7.	Objectivo	27
2.	Materiais e Métodos	28
2.1.	Amostras	29
2.2.	Extracção de DNA	30
2.3.	Amplificação por <i>nested</i> PCR de uma sequência do gene NS1 de parvovírus	31
2.4.	Amplificação por PCR de uma sequência do gene VP1 de parvovírus	33
2.4.1.	Bocavírus	33
2.4.2.	Bufavírus	33
2.5.	Purificação dos produtos de PCR	35
2.6.	Clonagem molecular	36

2.6.1.	Ligação de um fragmento de DNA ao vector <i>pGEM-T Easy</i>	37
2.6.2.	Transformação de <i>E. coli</i> JM109	37
2.6.3.	Identificação de clones recombinantes	38
2.6.4.	Extracção DNA plasmídico	39
2.6.5.	Digestão enzimática do DNA plasmídico	40
2.6.6.	Purificação de DNA plasmídico	40
2.7.	Sequenciação de DNA	41
2.8.	Análise bioinformática de sequências nucleotídicas	42
2.8.1.	Análise de cromatogramas e edição de sequências	42
2.8.2.	Análise bioinformática de sequências nucleotídicas	42
2.8.3.	Análise filogenética de sequências de DNA de parvovírus	42
3.	Resultados	44
3.1.	Detecção de parvovírus por PCR	45
3.1.1.	PARV4	45
3.1.2.	Bocavírus	46
3.1.3.	Bufavírus	48
3.1.4.	Replicação de bocavírus e bufavírus em culturas celulares	51
3.2.	Clonagem molecular de DNA de parvovírus	55
3.2.1.	PARV4	55
3.2.2.	Bocavírus	56
3.2.3.	Bufavírus	58
3.3.	Identificação de parvovírus por sequenciação	60
3.3.1.	PARV4	60
3.3.2.	Bocavírus	60
3.3.3.	Bufavírus	61
3.4.	Relações filogenéticas entre parvovírus baseadas em sequências NS1	65
3.4.1.	Bocavírus	65
3.4.2.	Protoparvovírus	68
4.	Discussão e Conclusões	71
5.	Referências bibliográficas	87
6.	Anexos	99
6.1.	Anexo 1	100

6.2.	Anexo 2	101
6.3.	Anexo 3	104
6.4.	Anexo 4	105
6.5.	Anexo 5	109
6.6.	Anexo 6	113
6.7.	Anexo 7	118
6.8.	Anexo 8	119

Índice de figuras

Figura 1 –	Estrutura dos parvovírus.	4
Figura 2 –	Esquema representativo dos genomas de parvovírus.	7
Figura 3 –	Replicação <i>Rolling Hairpin</i> .	16
Figura 4 –	Mapa físico do vector de clonagem <i>pGEM[®]-T Easy</i> .	37
Figura 5 –	Deteção de PARV4 em amostras fecais símias (gene NS1).	46
Figura 6 –	Deteção de BoV em amostras fecais símias (gene NS1).	47
Figura 7 –	Deteção de BoV em amostras fecais símias (gene VP1).	48
Figura 8 –	Deteção de BuV em amostras fecais símias (gene NS1).	49
Figura 9 –	Deteção de BuV em amostras fecais símias (gene NS1).	50
Figura 10 –	Deteção de BuV em amostras fecais símias (gene VP1).	51
Figura 11 –	Replicação de BoV (a) e BuV (b) em culturas celulares.	53
Figura 12 –	Gráfico representativo das taxas de detecção presuntivas de PARV4, BoV e BuV (gene NS1).	54
Figura 13 –	Clonagem dos amplicões do gene NS1 de PARV4.	56
Figura 14 –	Clonagem dos amplicões do gene VP1 de BoV.	57
Figura 15 –	Clonagem dos amplicões do gene VP1 de BuV.	59
Figura 16 –	Gráfico representativo das taxas de detecção de PARV4, BoV e BuV (gene NS1).	63
Figura 17 –	Árvore de relações filogenéticas de bocavírus (BoV).	67
Figura 18 –	Árvore de relações filogenéticas de protoparvovírus.	70

Índice de tabelas

Tabela 1 –	<i>Primers</i> utilizados nas reacções de amplificação de sequências NS1 de PARV4, bocavírus (BoV) e bufavírus (BuV).	32
Tabela 2 –	<i>Primers</i> utilizados nas reacções de amplificação de sequências VP1 de bocavírus (BoV) e bufavírus (BuV).	34

Lista de siglas, abreviaturas e acrónimos

A, T, C, G	Bases orgânicas constituintes dos nucleótidos (adenina, timina, citosina, guanina)
ADB	Tampão de dissolução de agarose, do inglês <i>Agarose Dissolving Buffer</i>
BoV	Vírus <u>B</u> ocay <u>v</u> irus
BuV	Vírus <u>B</u> ufay <u>v</u> irus
B19	<i>Erythoparvovirus</i> B19
Cdk2	Cinase dependente de ciclina 2, do inglês <i>cyclin-dependent kinase 2</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>et al.</i>	Do latim <i>et alli</i> , indica que a obra referenciada tem mais que um autor, sendo apenas mencionado o primeiro
F	<i>Primer</i> directo, do inglês <i>Forward</i>
HAE-ALI	Células do epitélio respiratório humano, do inglês <i><u>H</u>uman <u>A</u>irway <u>E</u>pithelium – cultured at an <u>A</u>ir-<u>L</u>iquid <u>I</u>nterface</i>
HBV	Vírus da hepatite B, do inglês <i><u>H</u>epatitis <u>B</u> <u>V</u>irus</i>
HCV	Vírus da hepatite C, do inglês <i><u>H</u>epatitis <u>C</u> <u>V</u>irus</i>
HEK293	Células humanas de rim embrionário, do inglês <i><u>H</u>uman <u>E</u>mbrionic <u>K</u>idney <u>C</u>ells</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i><u>H</u>uman <u>I</u>mmunodeficiency <u>V</u>irus</i>
<i>i.e.</i>	Abreviação da expressão do latim <i>id est</i> que significa “isto é”
IAS	<i>Primer</i> interno e reverso, do inglês <i><u>I</u>nnner <u>A</u>ntisense</i>
ICTV	Comité Internacional para a Taxonomia dos Vírus, do inglês <i><u>I</u>nternational <u>C</u>ommittee for <u>T</u>axonomy of <u>V</u>iruses</i>

IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
IS	<i>Primer interno e directo, do inglês <u>I</u>nn<u>e</u>r <u>S</u>ense</i>
LacZ	Gene do operão <i>lac</i> que codifica a β -galactosidase
LB	Meio de <u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NP	Proteína Nuclear, do inglês <i>Nuclear Protein</i>
NPC	Complexo do poro nuclear, do inglês <i>Nuclear Pore Complex</i>
NS	Proteína não estrutural, do inglês <u>N</u> on <u>S</u> tructural Protein
nt(s)	nucleótido(s)
Nups	Nucleoporinas
OAS	<i>Primer externo e reverso, do inglês <u>O</u>uter <u>A</u>nti<u>s</u>ense</i>
ORF	Grelha de leitura aberta, do inglês <u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame
OS	<i>Primer externo e directo, do inglês <u>O</u>uter <u>S</u>ense</i>
p/v	Peso por volume
PARV4	Vírus tetraparvovírus PARV4
pb	Par de bases, dois nucleótidos opostos e complementares nas cadeias de DNA ou RNA conectados por ligações de hidrogénio
PBS	Soro fisiológico tamponado com fosfatos, do inglês <u>P</u> hosphate- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
PCR	Reacção em cadeia da polimerase de DNA, do inglês <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PEG	Polietilenoglicol
PKC	Proteína cinase C, do inglês <u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>C</u>
PLA ₂	Fosfolipase A ₂ , do inglês <u>P</u> hospholipase <u>A</u> ₂
pré-mRNA	Precursor do ácido ribonucleico mensageiro

R	<i>Primer reverso, do inglês <u>R</u>everse</i>
RFDNA	Intermédio replicativos de DNA cadeia dupla, do inglês <u>R</u> eplicative <u>F</u> orm <u>D</u> NA
RHR	Mecanismo de deslocação e replicação da cadeia simples, do inglês <u>R</u> olling <u>H</u> airpin <u>R</u> eplication
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <u>R</u> ibon <u>u</u> cleic <u>A</u> cid
rpm	Rotações por minuto
SAT	Pequena proteína traduzida alternativamente, do inglês <u>S</u> mall <u>A</u> lternatively <u>T</u> ranslated <u>P</u> rotein
SDS	Dodecilsulfato de sódio, do inglês <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate
ssDNA	DNA de cadeia simples, do inglês <u>s</u> ingle <u>s</u> tranded <u>D</u> NA
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSS	Solução de transformação e armazenamento, do inglês <u>T</u> ransformation and <u>S</u> torage <u>S</u> olution
VP	Proteína viral estrutural, do inglês <u>V</u> iral <u>P</u> rotein
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo

1.Introdução

Os parvovírus são, tal como o nome sugere (*parvo* do latim pequeno), vírus pequenos, sem invólucro, com genoma de DNA de cadeia simples (ssDNA) linear, que constituem a família *Parvoviridae* (Berns and Parrish, 2013; Cotmore and Tattersall, 2014).

Os parvovírus são ubíquos na natureza e infectam uma vasta variedade de hospedeiros (Berns and Parrish, 2013; Cotmore and Tattersall, 2014). De acordo com o hospedeiro que infectam dividem-se em duas subfamílias, *Densovirinae* e *Parvovirinae*, os que infectam hospedeiros não vertebrados e os que infectam hospedeiros vertebrados, respectivamente (Cotmore *et al.*, 2014). Presentemente, o Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) divide a subfamília *Densovirinae* em cinco géneros (*Ambidensovirus*, *Iteradensovirus*, *Hepandensovirus*, *Penstylidensovirus* e *Brevidensovirus*) e a subfamília *Parvovirinae* em oito géneros (*Protoparvovirus*, *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Copiparvovirus* e *Tetraparvovirus*) (ICTV).

1.1. História

Em 1928, foram identificadas em felinos doenças caracterizadas por inflamações na mucosa do intestino, redução acentuada do número de glóbulos brancos e ataxia, estas eram causadas por um vírus, que viria a ser denominado vírus da panleucopenia felina ou FPV (do inglês *feline panleukopenia virus*) (Berns and Parrish, 2013). No final dos anos 40, foi descrita uma doença semelhante em martas e, posteriormente, determinou-se que era causada por vírus muito pequenos semelhantes (Berns and Parrish, 2013). No final dos anos 50 e início dos anos 60 foram identificados vários parvovírus de roedores, incluindo o *Kilham rat virus* (KRV), o vírus H-1 e o *Minute virus of mice* (MVM) (Wan *et al.*, 2002). No início dos anos 60, foram também observadas por microscopia electrónica pequenas partículas virais em preparações de adenovírus de origem humana (Berns and Parrish, 2013). Inicialmente pensava-se que estas partículas eram contaminantes das preparações, e só em 1967 foram isolados e classificados como vírus adeno-associados (AAV) (Brown, 2010; Berns and Parrish, 2013). Os AAVs (do inglês *adeno-associated viruses*), inseridos no género *Dependoparvovirus*, são vírus que necessitam de co-infecção com um vírus auxiliar para produzirem uma infecção produtiva. Normalmente os vírus auxiliares são adenovírus ou, menos frequentemente, herpesvírus (Berns and Parrish, 2013). Por causarem infecção persistente não patogénica, os AAV têm sido desenvolvidos como vectores para terapia génica (Brown, 2010).

Em 1974 foi descrito o primeiro parvovírus autónomo humano, o vírus B19, identificado no soro de um dador de sangue assintomático testado para o vírus da hepatite B (Cossart *et al.*, 1975; Berns and Parrish, 2013). A sua replicação não dependia de outros vírus auxiliares, mas apenas da infecção de células em divisão activa (Cossart *et al.*, 1975; Sharp *et al.*, 2010). O parvovírus B19, mais frequentemente associado à “quinta doença” ou eritema infeccioso em crianças, foi durante três décadas o único parvovírus humano autónomo conhecido. Só em 2005 foram descobertos os bocavírus humanos (HBoV) e os parvovírus 4 (PARV4) e, mais recentemente, em 2012, foram descobertos os bufavírus humanos (BuV) (Allander *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2005; Phan *et al.*, 2012).

Para além do Homem, na última década foram identificados PARV4, BoV e BuV noutros hospedeiros primatas (Kapoor *et al.*, 2010a; Sharp *et al.*, 2010; Sasaki *et al.*, 2015). No entanto ainda não foram estabelecidos modelos animais ou culturas celulares para o estudo dos parvovírus humanos (à excepção de HBoV1), não estando bem determinada a relação entre estes vírus e as respectivas patologias associadas nem claramente estabelecidas as relações filogenéticas entre eles (Altay *et al.*, 2015; Chieochansin *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015).

1.2. Estrutura do virião e organização do genoma

1.2.1. Estrutura do virião

Os parvovírus são partículas virais sem invólucro, muito resistentes às condições ambientais, mantendo a infecciosidade numa gama de pH entre 3 e 9 e mesmo após tratamento a 56°C durante 1 h (Berns and Parrish, 2013).

As cápsides dos parvovírus são pequenas (cerca de 18 a 26 nm de diâmetro) e de estrutura icosaédrica ($T = 1$) construída com 60 unidades de proteínas da cápside (VP) (Figura 1) (Strauss and Strauss, 2002; Norkin, 2010; Berns and Parrish, 2013). Uma vez que 60 é o menor número possível de unidades de proteínas da cápside necessárias para formar um cápside icosaédrica, os parvovírus são os vírus estruturalmente mais simples com esta simetria (Norkin, 2010). No entanto, os parvovírus não utilizam apenas uma proteína da cápside, mas sim duas a três proteínas diferentes. Dependendo do género do parvovírus, a proteína da cápside pode apresentar 1 a 3 variantes, VP1, VP2 e VP3 (Norkin, 2010; Berns and Parrish, 2013).

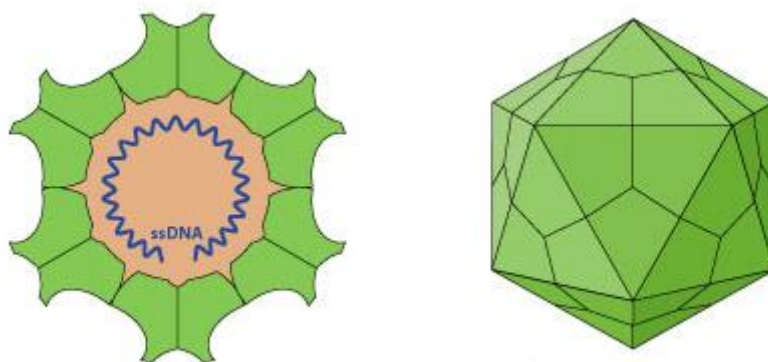


Figura 1 – Estrutura dos parvovírus. Figura esquemática representativa da estrutura da partícula viral de parvovírus com simetria icosaédrica ($T=1$), com cerca de 18 a 26 nm de diâmetro. Adaptado de *Viral Zone*.

1.2.2. Estrutura e organização do genoma

Os parvovírus têm como genoma uma molécula de ssDNA (~5 kb) cujas extremidades contêm sequências palindrômicas imperfeitas (116-385 b). Estas dobram-se sobre si mesmas e, através do emparelhamento de bases, formam estruturas parcialmente de cadeia dupla em gancho de cabelo (*hairpin*), essenciais para a replicação e encapsidação do DNA (Berns and Parrish, 2013; Cotmore and Tattersall, 2014). Estas estruturas *hairpin* podem ter uma estrutura igual ou diferente nas duas extremidades, sendo os genomas virais/vírus denominados homoteloméricos ou heteroteloméricos (Figura 2), respectivamente (Cotmore and Tattersall, 2014).

Os protoparvovírus, bocaparvovírus e amdoparvovírus são vírus heteroteloméricos. As estruturas *hairpin* diferentes são processadas por mecanismos de corte das extremidades distintos e a diferentes velocidades, o que leva à encapsidação preferencial das cadeias de DNA com polaridade negativa (Manteufel and Truyen, 2008; Cotmore and Tattersall, 2014). Pelo contrário, nos tetraparvovírus, dependoparvovírus e eritroparvovírus (vírus homoteloméricos) as estruturas *hairpin*, iguais nas duas extremidades do genoma, conduzem a um mecanismo equivalente de corte das extremidades e subsequente encapsidação de cadeias de DNA com polaridade negativa e positiva em partículas separadas, mas em proporções semelhantes (Brown, 2010; Cotmore and Tattersall, 2014).

O genoma simples dos parvovírus possui duas ORFs principais. A primeira, situada na metade esquerda, apresenta o gene que codifica para as proteínas não estruturais, designado *Rep* no caso dos dependoparvovírus e NS no caso dos vírus com replicação autónoma. A segunda, situada na metade direita, compreende o gene que codifica as proteínas da cápside, denominado *cap* no caso dos dependoparvovírus e VP no caso dos vírus com replicação autónoma (Norkin, 2010; Berns and Parrish, 2013; Cotmore and Tattersall, 2014).

Os parvovírus, apresentam diferentes estratégias de expressão dos seus genes, geralmente típicas de cada género, em que é usado um número diferente de promotores, mecanismos de *splicing* e locais de poliadenilação. Os dependoparvovírus (Figura 2a) têm dois promotores, P5 e P19, em diferentes locais do gene *Rep*, para gerar diferentes

mRNAs (Norkin, 2010; Shen *et al.*, 2015). As proteínas Rep 78 e Rep 68 são traduzidas de mRNAs de maiores dimensões transcritos a partir do promotor P5, as proteínas Rep 52 e Rep 40 são expressas de mRNAs menores transcritos a partir do promotor P19 (Norkin, 2010; Shen *et al.*, 2015). Os diferentes vírus do gênero usam também diferentes mecanismos de acesso à zona codificante do gene *cap*, AAV2 usa a transativação do promotor P40 para gerar os mRNAs que codificam as proteínas da cápside, enquanto AAV5 excisa um intrão, que contem um local de poliadenilação localizado entre as duas ORFs, permitindo a extensão do mRNA ao longo do gene da cápside (Fasina, Dong and Pintel, 2016).

O eritroparvovírus B19 apresenta no seu genoma um promotor e dois locais de poliadenilação (Figura 2b) (Brown, 2010; Cotmore and Tattersall, 2014). Após transcrição do gene NS, ocorre excisão de um intrão que inclui um local de poliadenilação localizado entre as duas ORFs, permitindo a extensão do mRNA ao longo da região codificadora de VP (Fasina, Dong and Pintel, 2016).

O protoparvovírus MVM apresenta dois promotores (Figura 2d). O primeiro (P4) é responsável pela iniciação da transcrição do gene NS. Após a síntese das proteínas NS1 e NS2, ocorre a transativação do outro promotor (P38) que gera os mRNAs que são traduzidos nas proteínas da cápside (VP1 e VP2), e SAT terminando a transcrição no local de poliadenilação único situado no final do genoma (Cotmore and Tattersall, 2014; Fasina, Dong and Pintel, 2016).

O genoma dos bocaparvovírus apresenta um único promotor (P5) e dois locais de poliadenilação (Figura 2e), um localizado no centro do genoma na região codificante de VP e outro mais à direita no genoma (Cotmore and Tattersall, 2014; Fasina, Dong and Pintel, 2016). O bocaparvovírus MVC (*minute virus of canines*) gera um único pré-mRNA, que posteriormente pode ou não sofrer *splicing* alternativo e/ou poliadenilação, gerando vários mRNAs (Shen *et al.*, 2015; Fasina, Dong and Pintel, 2016). A transcrição da maioria dos mRNAs ignora o local de poliadenilação no meio do genoma, permitindo a síntese de mRNAs que se estendem pela região codificante VP até ao local de poliadenilação terminal (Fasina, Dong and Pintel, 2016).

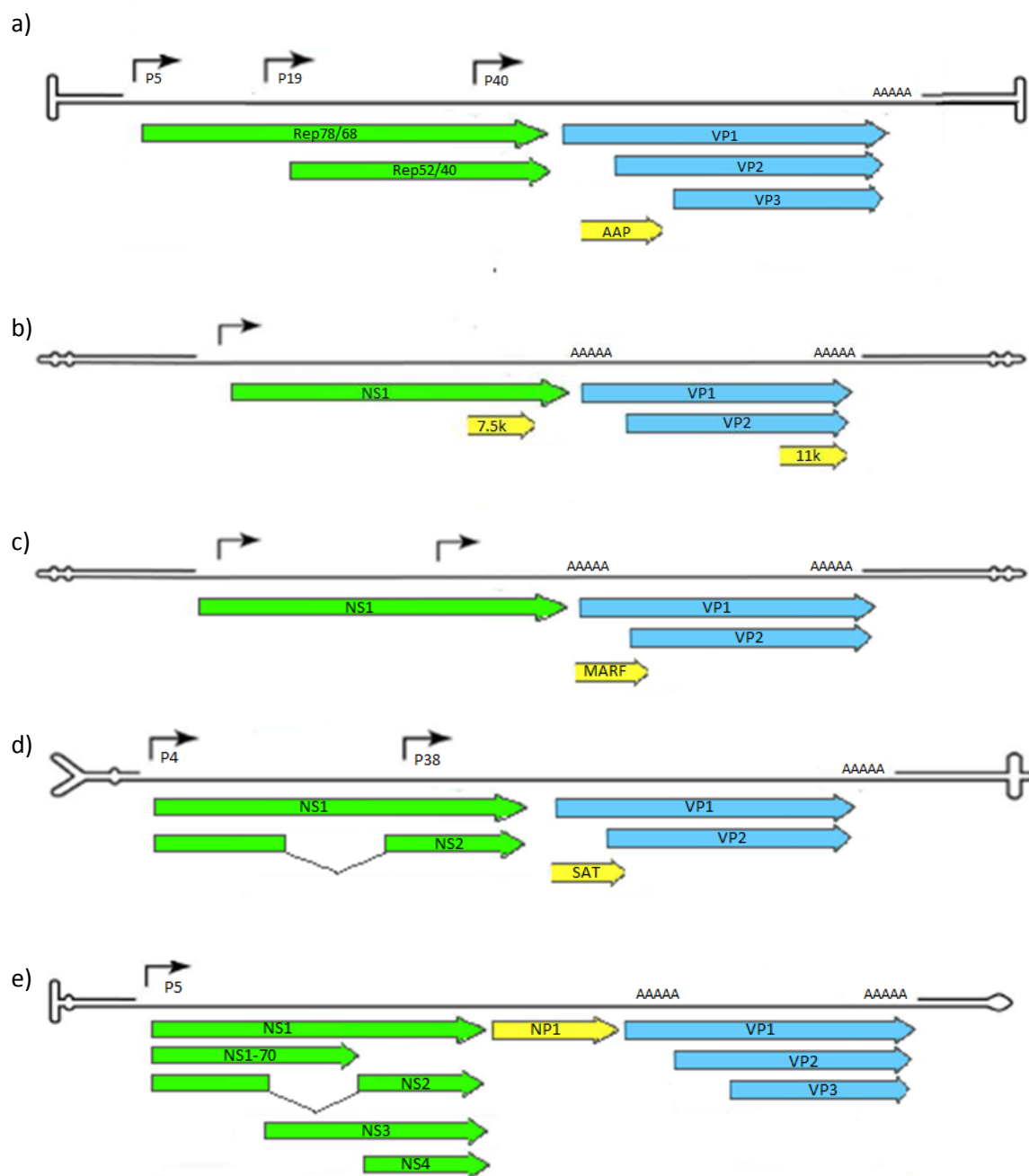


Figura 2 – Esquema representativo dos genomas de parvovírus. Esquema representativo dos genomas dos representantes de alguns géneros da subfamília *Parvovirinae* a) AAV, dependoparvovírus b) B19, eritroparvovírus c) PARV4, tetraparvovírus d) MVM, protoparvovírus e) HBoV1, bocaparvovírus. A linha preta representa o genoma completo homotelomérico (a, b, c) ou heterotelomérico (d, e) e as setas pretas representam os promotores da transcrição; a verde estão representadas as proteínas não estruturais, a azul as

proteínas estruturais e a amarelo as proteínas auxiliares; as setas indicam a direcção da transcrição dos genes; os locais de poliadenilação estão representados por “AAAAA” (adaptado de Cotmore and Tattersall, 2014).

1.3. Proteínas virais

As proteínas não estruturais NS1 e Rep 78/68 (~70-100 kDa), codificadas por genes muito conservados, estão essencialmente envolvidas na iniciação da replicação do genoma viral e são comparáveis em termos de função (Norkin, 2010). Nos dependoparvovírus ocorre ainda a expressão de versões menores da proteína Rep, denominadas Rep 52 e Rep 40, que têm como principal função auxiliar na encapsidação do genoma viral, mediada pela actividade de helicase (Norkin, 2010; Shen *et al.*, 2015).

A proteína NS1 é uma fosfoproteína nuclear, com múltiplos domínios possuindo actividades enzimáticas altamente conservadas (Cotmore *et al.*, 2014; Cotmore and Tattersall, 2014). Apresenta na região N-terminal um domínio de reconhecimento, ligação a DNA e actividade de endonuclease específica de sequência, no centro um domínio com actividade de ATPase e helicase e na região C-terminal um domínio de transactivação de promotores virais (Cotmore *et al.*, 2014; Cotmore and Tattersall, 2014; Shen *et al.*, 2015). Esta proteína é essencial na replicação do DNA viral e expressão dos genes virais, mas também está envolvida na paragem do ciclo celular e apoptose (Malecki, Schildgen and Schildgen, 2011; Cotmore and Tattersall, 2014; Angelova *et al.*, 2015).

Proteínas NS de menores dimensões (Figura 2) são produzidas por *splicing* alternativo dos transcritos de alguns parvovírus (Berns and Parrish, 2013; Shen *et al.*, 2015). A proteína NS2, codificada nos genomas de protoparvovírus, tem um extremo N-terminal e um extremo C-terminal igual a NS1 mas com ausência dos domínios ATPase e helicase (Norkin, 2010; Cotmore and Tattersall, 2014; Shen *et al.*, 2015). NS2 tem 3 isoformas, P, Y e L, que diferem na sequência da região C-terminal e com várias funções atribuídas, designadamente no transporte nuclear dos novos viriões (Engelsma *et al.*, 2008; Cotmore and Tattersall, 2014; Shen *et al.*, 2015).

Relativamente aos bocavírus, foi descrita a expressão de quatro proteínas NS com dimensões inferiores a NS1 (Figura 2) em linhas celulares contínuas e culturas primárias de células polarizadas do epitélio respiratório humano infectadas com HBoV1 (Shen *et al.*, 2015). NS1-70 contém o domínio de endonuclease e de helicase de NS1, mas não a extremidade C-terminal, é expressa abundantemente e, juntamente com NS1,

é responsável pela inibição da activação de NF- κ B, possivelmente é um mecanismo de escape à resposta imunitária (Liu *et al.*, 2016a). As restantes três proteínas NS mais pequenas possuem os domínios de ligação a DNA/endonuclease e transactivação (NS2), helicase e transactivação (NS3) e transactivação (NS4), e não são essenciais para a replicação em linhas celulares contínuas. Porém, NS2 é crítica para a replicação viral em culturas primárias do epitélio respiratório que não estão em divisão activa (Shen *et al.*, 2015).

A maioria das cápsides dos parvovírus é construída com combinações de duas a três proteínas da cápside diferentes, VP1 a VP3, de acordo com o género do vírus (Figura 2). Os protoparvovírus, tetraparvovírus e eritroparvovírus codificam apenas duas proteínas da cápside viral (VP1 e VP2) (Canuti *et al.*, 2011; Phan *et al.*, 2012). Os AAVs e bocaparvovírus codificam três proteínas da cápside (VP1, VP2 e VP3) (He *et al.*, 2013). Estas proteínas possuem uma região C-terminal comum e uma região N-terminal de dimensões variáveis e resultam da tradução de transcritos produzidos por *splicing* alternativo e corte proteolítico no caso de VP3 (Norkin, 2010; Cotmore and Tattersall, 2014).

VP1, a proteína mais longa, possui uma região N-terminal única (VP1uR, VP1 *unique N-terminal region*), conservada em todos os vírus da subfamília *Parvovirinae*, com actividade de fosfolipase A₂ (PLA₂) e responsável pela transferência dos viriões dos endossomas para o citosol (Suikkanen, 2003; Dorsch *et al.*, 2002).

Geralmente a cápside é composta por apenas 5 a 10 cópias da proteína VP1 e uma das outras proteínas menores da cápside é predominante, variando consoante o género do parvovírus (Norkin, 2010; Cotmore and Tattersall, 2014). No caso dos dependoparvovírus, VP3 constitui mais de 80% da cápside, enquanto nos outros géneros VP2 é a mais abundante (Norkin, 2010; Cotmore and Tattersall, 2014; Matthews *et al.*, 2014). No caso dos protoparvovírus, a cápside é formada por apenas 10 cópias da proteína VP1 e 50 cópias de VP2 (Maroto *et al.*, 2004; Cotmore and Tattersall, 2014).

A maioria dos parvovírus codifica, na região central do genoma, proteínas auxiliares específicas de cada género e de função ainda parcialmente conhecida (Mihaylov, Cotmore and Tattersall, 2014)

Os AAVs codificam uma proteína auxiliar AAP (*Assembly-Activating Protein* (Figura 2a)), na extremidade 5' do gene cap, numa grelha de leitura distinta, que promove a translocação das novas proteínas da cápside para o núcleo e a morfogénese das cápsides virais (Naumer *et al.*, 2012).

Os vírus B19 e eritroparvovírus semelhantes apresentam uma pequena ORF codificadora da proteína auxiliar de 11 KDa (Figura 2b) que está envolvida na montagem e transporte das cápsides nas células infectadas (Zhi *et al.*, 2006) e ainda na indução da apoptose das células progenitoras eritróides (Chen *et al.*, 2010).

O parvovírus PARV4 e parvovírus semelhantes a este apresentam uma pequena ORF adicional, MARF (*Middle Alternative Reading Frame*), que se sobrepõe ao motivo PLA₂ de VP1 mas localizada numa grelha de leitura diferente (Figura 2c). O seu tamanho varia de acordo com o vírus (de 67 aminoácidos em vírus de primatas a 84 em vírus de bovinos e suínos) e a sua função é desconhecida (Canuti *et al.*, 2011).

Os bocaparvovírus apresentam também uma terceira ORF, no centro do genoma, que codifica uma proteína não estrutural designada NP1 (*Nuclear Protein 1*), única dos bocaparvovírus (Figura 2e) (Lederman *et al.*, 1984; Schwartz *et al.*, 2002; Yoo *et al.*, 2015). Esta proteína está envolvida no processamento dos transcritos virais, sendo necessária para um *splicing* eficiente e também para a supressão do local de poliadenilação interno que permite a transcrição do gene da cápside (Fasina, Dong and Pintel, 2016). Ainda, recentemente, foi descrita a interacção de NP-1 de bocavírus de suínos com o domínio de ligação a DNA de IRF3, bloqueio da associação deste factor de transcrição ao promotor de IFN- β e consequente inibição da produção de IFN- β , o que poderá constituir um mecanismo de escape imunitário destes vírus (Zhang *et al.*, 2016).

O genoma dos protoparvovírus codifica também uma proteína auxiliar designada SAT (*Small Alternatively Translated protein*) (Figura 2d), esta é traduzida a partir do mesmo mRNA de VP2, numa ORF diferente, através de um mecanismo de *leaky scanning*. Esta proteína não estrutural, expressa numa fase mais tardia da infecção parece afectar a disseminação da infecção em culturas celulares, (Zádori, Szelei and Tijssen, 2005).

1.4. Ciclo replicativo

A maioria dos vírus de DNA tem capacidade de induzir a divisão da célula hospedeira infectada, com o objectivo de aceder à maquinaria de replicação celular e sintetizarem o DNA genómico viral. Os parvovírus não o conseguem fazer (Strauss and Strauss, 2002; Cotmore and Tattersall, 2014). Assim, como não codificam DNA polimerase, os parvovírus de replicação autónoma estão, maioritariamente, dependentes das enzimas da célula hospedeira, quando estas estão na fase S do ciclo celular, para a replicação eficaz do seu DNA. Com base, em parte, nesta característica alguns parvovírus têm sido explorados como vírus oncolíticos, *i.e.* capazes de selectivamente infectarem e destruir células tumorais ao mesmo tempo poupando as suas contrapartes normais (Marchini *et al.*, 2015). As patologias resultantes das infecções por parvovírus são frequentemente resultado do tropismo celular dos vírus e consequente efeito citopático (CPE), em que a morte celular induzida durante a infecção pode ser mediada por apoptose ou necrose (Chen and Qiu, 2010; Berns and Parrish, 2013). Os dependoparvovírus estão dependentes da co-infecção com outro vírus (Brown, 2010). Quando infectam uma célula não permissiva, ou seja uma célula que não está infectada pelo vírus auxiliar, estabelece-se uma infecção latente sendo o DNA viral integrado no cromossoma do hospedeiro. Após a infecção da célula por um vírus auxiliar, o DNA viral é excisado e replicado (Strauss and Strauss, 2002). Em células humanas o DNA viral é integrado especificamente no cromossoma 19 (Strauss and Strauss, 2002).

1.4.1. Entrada na célula

A entrada na célula é mediada pela ligação das proteínas da cápside do parvovírus a receptores da membrana da célula hospedeira, alguns dos quais ainda não identificados.

A maioria dos parvovírus liga-se a glicanos de carga negativa, tais como ácido siálico e sulfato de heparano, abundantes na superfície celular e cuja heterogeneidade entre diferentes espécies e tecidos permite uma grande diversidade de tropismo viral (Huang, Halder and Agbandje-McKenna, 2014). No entanto, frequentemente, os glicanos são apenas factores de ligação e não são suficientes para mediar a entrada do vírus. Por exemplo, apesar dos protoparvovírus CPV e FPV se ligarem a ácido siálico este não é essencial para infecção e a infecção da célula hospedeira requer o reconhecimento do

receptor da transferrina tipo-1 celular (Palermo, Hafenstein and Parrish, 2006). Contrariamente, para alguns protoparvovírus de roedores (*e.g.* MVM, LuIII) e parvovírus porcino (PPV), e para o bocavírus BPV (parvovírus bovino) o ácido siálico é necessário e suficiente para a entrada (Huang, Halder and Agbandje-McKenna, 2014; Tu *et al.*, 2015).

Pensa-se que, de um modo geral, a entrada dos parvovírus na célula seja mediada pela via de endocitose dependente da clatrina (Snoussi and Kann, 2014; Tu *et al.*, 2015). A acidificação dos endossomas causa a exposição do domínio PLA₂, o qual, através da destruição da integridade da membrana endossomal, é essencial para transferência da partícula viral para o citosol (Rocha, 2014; Snoussi and Kann, 2014; Tu *et al.*, 2015). Concomitante com a exposição da PLA₂, e devido à acidificação no compartimento endossomal, ocorre a exposição de sinais de localização nuclear localizados na região N-terminal de VP1 (Rocha, 2014; Cotmore and Tattersall, 2014; Snoussi and Kann, 2014). Pelo que após a entrada das partículas virais no citosol, estas são transportadas através de microtúbulos até à periferia do núcleo (Rocha, 2014; Snoussi and Kann, 2014; Tu *et al.*, 2015).

1.4.2. Transporte nuclear

Para os vírus que sintetizam o seu genoma no núcleo, como os parvovírus, o mecanismo de transporte nuclear é uma parte essencial da infecção. O Complexo Poro Nuclear (NPC) consegue transportar partículas até um máximo de 39 nm de diâmetro e algumas cápsides virais conseguem atravessar o NPC intactas e desintegram-se no núcleo (Snoussi and Kann, 2014; Fay and Panté, 2015).

Devido ao seu tamanho reduzido, era este o mecanismo de transporte nuclear que se julgava ser usado pela generalidade dos parvovírus. Todavia, estes desenvolveram um modo alternativo e novo para transpor o invólucro nuclear que consiste na indução de pequenas disrupções no invólucro nuclear (Fay and Panté, 2015).

O mecanismo ainda não é claro mas é provável que a interacção do parvovírus com as nucleoporinas (*Nups*) do NPC leve à disrupção da membrana nuclear, com envolvimento de enzimas celulares como caspase-3, proteína cinase c (PKC) e cinase-2

dependente de ciclina (cdk2), e transposição da membrana nuclear pela cápside viral (Fay and Panté, 2015).

1.4.3. Síntese do DNA genómico viral e expressão dos genes virais

A replicação do genoma viral ocorre no núcleo e é levada a cabo por enzimas celulares (DNA polimerases α e δ), assistidas por algumas proteínas virais não estruturais (Norkin, 2010; Cotmore *et al.*, 2014; Cotmore and Tattersall, 2014; Snoussi and Kann, 2014). Quando as células infectadas entram na fase S do ciclo celular os genomas virais são ejectados a partir das partículas intactas no núcleo da célula (Cotmore and Tattersall, 2014). Na primeira fase da replicação a estrutura *hairpin* na extremidade 3' do genoma serve como *primer* para a síntese da nova cadeia de DNA e subsequente produção de um intermediário replicativo de DNA de cadeia dupla ((RF)DNA) (Figura 3A) (Berns and Parrish, 2013; Cotmore and Tattersall, 2014). Porém, quando da síntese da nova cadeia de DNA, não é possível desfazer a estrutura *hairpin* da extremidade 5' para permitir a sua progressão até ao final do genoma, pelo que é necessária a actividade de helicase de NS1 e consequentemente a expressão dos genes virais (Cotmore and Tattersall, 2014). Então, o (RF)DNA é usado como *template* para a transcrição da ORF1 pela RNA polimerase celular II (RNA pol II) (Norkin, 2010; Snoussi and Kann, 2014). Quando a proteína NS1 fica disponível (Figura 3B), a sua actividade de endonuclease faz um corte na cadeia de DNA sintetizada de novo e fica covalentemente ligada à extremidade 5' (Figura 3C) (Cotmore and Tattersall, 2014). Este corte cria uma nova extremidade 3' que permite continuar a síntese da cadeia sintetizada de novo até ao extremo do genoma parental, com a estrutura *hairpin* aberta pela actividade de helicase da NS1 (Figura 3D e E) (Cotmore and Tattersall, 2014).

O genoma viral é então amplificado por um mecanismo de deslocação da cadeia simples, chamado replicação de *Rolling Hairpin* (RHR) que assegura a duplicação dos dois extremos da cadeia (Figura 3) (Cotmore and Tattersall, 2014). O modelo RHR é uma adaptação do mecanismo de replicação em círculo rolante (*Rolling Circle*) usado por vírus com genoma DNA pequeno e circular (Cotmore and Tattersall, 2014). No mecanismo usado pelos parvovírus, os telómeros, com estrutura *hairpin*, dobram-se e desdobram-se para inverter o garfo de replicação unidireccional, com a extremidade 3' a servir de *primer* para a síntese do DNA (Figura 3F-J) (Strauss and Strauss, 2002;

Cotmore and Tattersall, 2014). Desta síntese resultam concatâmeros de cadeia dupla de unidades de genoma viral fundidos por junções palindrômicas, onde ocorre a excisão de genomas individuais com intervenção de NS1 e de proteínas celulares (Cotmore and Tattersall, 2014).

A proteína NS1, para além do seu papel na síntese do DNA viral, regula a expressão dos genes virais, nomeadamente através da transactivação dos promotores das proteínas estruturais quando existem (Berns and Parrish, 2013; Snoussi and Kann, 2014).

1.4.4. Montagem e saída dos novos viriões

As proteínas estruturais sintetizadas no citoplasma são transportadas para o núcleo onde formam cápsides virais vazias (Berns and Parrish, 2013; Cotmore and Tattersall, 2014). O aumento da disponibilidade das cápsides leva ao início da encapsidação do genoma viral que é translocado para dentro destas, através de um canal portal localizado num dos vértices da cápside. Esta translocação é mediada pela actividade de helicase da proteína não estrutural NS1 associada ao genoma viral (Berns and Parrish, 2013; Cotmore and Tattersall, 2014). O transporte das partículas virais para fora do núcleo é mediado pela extremidade N-terminal de VP2, exposta na cápside viral, e que funciona como sequência de exportação nuclear (NES) (Maroto *et al.*, 2004). Subsequentemente, são transportadas em vesículas através do retículo endoplasmático (ER) até ao Golgi e depois para a periferia celular (Bär, Rommelaere and Nüesch, 2013). Na passagem pelo ER e Golgi os viriões sofrem maturação através de modificações pós-montagem, como seja a fosforilação das cápsides no Golgi. O transporte vesicular dos parvovírus origina a destruição dos filamentos de actina e acelera a lise celular (Bär, Rommelaere and Nüesch, 2013).

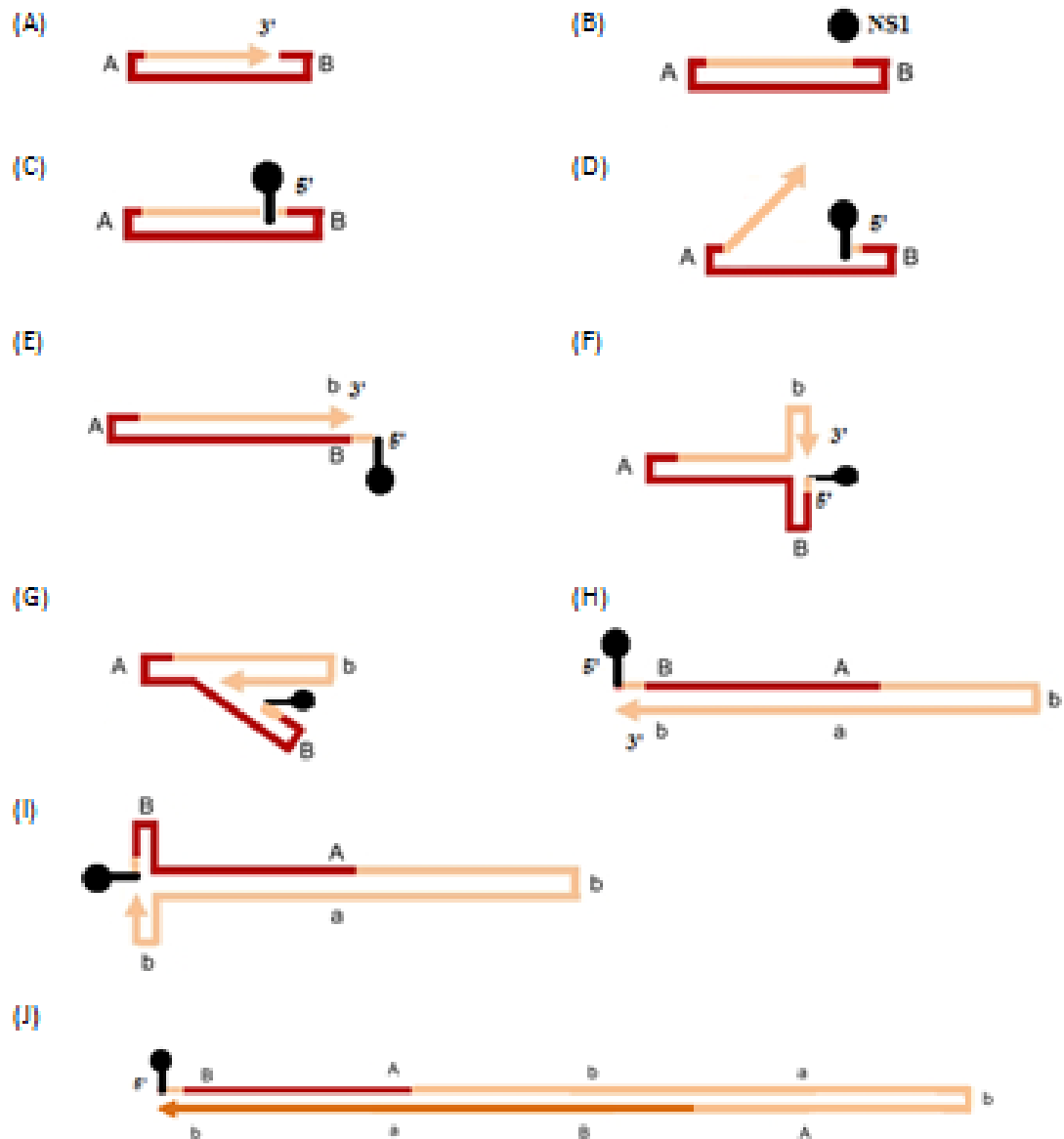


Figura 3 – Replicação *Rolling Hairpin*. Representação esquemática das etapas do modelo de replicação *Rolling Hairpin* utilizado pelos parvovírus. A e B representam os telômeros esquerdo e direito, respectivamente, a e b representam as sequências complementares dos mesmos. A cadeia de DNA viral é representada pela cor mais escura e a nova cadeia de DNA sintetizada pela cor mais clara, a extremidade 3' da cadeia é representada pela seta. (modificado de Cotmore and Tattersall, 2014)

1.5. Classificação e diversidade genética

1.5.1. Classificação

A família *Parvoviridae* inclui vírus que infectam uma grande variedade de hospedeiros, reflectido pela divisão desta família em duas subfamílias consoante o hospedeiro que infectam, *Densovirinae* e *Parvovirinae*, os que infectam hospedeiros não vertebrados e vertebrados, respectivamente (Cotmore and Tattersall, 2014). Para que um agente seja classificado como membro da família *Parvoviridae* tem de ser isolado e sequenciado o seu genoma ou, caso não se consiga o isolamento, tem de ser sequenciado a partir de tecidos, secreções ou excreções com origem num hospedeiro inequívoco, suportado por evidências da sua distribuição em múltiplos hospedeiros individuais, num padrão compatível com a disseminação por infecção. A sequência deve estar completa, incluir as regiões codificadoras de proteínas não estruturais e estruturais e o seu tamanho e padrões têm que coincidir com os característicos da família (Cotmore *et al.*, 2014).

O Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) divide a subfamília *Densovirinae* em cinco géneros (*Ambidensovirus*, *Iteradensovirus*, *Hepandensovirus*, *Penstylidensovirus* e *Brevidensovirus*) e a subfamília *Parvovirinae* em oito géneros (*Protoparvovirus*, *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Copiparvovirus* e *Tetraparvovirus*). Recentemente foram propostos dois novos géneros na subfamília *Parvovirinae*, os géneros *Marinoparvovirus* e *Chapparpovirus* (Phan *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016). O primeiro inclui apenas um membro denominado sesavírus que foi identificado num leão-marinho-da-Califórnia (Phan *et al.*, 2015), o segundo inclui vírus identificados em galinhas, perus, roedores, morcegos e suínos (Yang *et al.*, 2016).

O termo “parvovírus” é genericamente usado para referir membros da família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae*. Ao longo deste trabalho o termo vírus PARV4 é frequentemente usado para designar vírus do género *Tetraparvovirus*, enquanto bocavírus é usado para vírus do género *Bocaparvovirus* e bufavírus para vírus dentro da espécie *Primate protoparvovirus 1* do género *Protoparvovirus* em oposição aos vírus da espécie *Carnivore protoparvovirus 1* do mesmo género.

De acordo com a nova taxonomia proposta em 2013, todos os parvovírus que pertençam ao mesmo género têm que ser monofiléticos e codificar proteínas NS1 com identidade >30% ao nível da sequência de aminoácidos, mas identidade <30% com as proteínas codificadas por vírus de outros géneros quando do alinhamento de sequências (Cotmore *et al.*, 2014). Na subfamília *Densovirinae* apenas existem disponíveis sequências para um limitado número de vírus com importância económica, não reflectindo a diversidade de vírus que infectam artrópodes, por esta razão a identidade >30% é menos rigorosa nesta subfamília (Cotmore *et al.*, 2014).

Por outro lado, os vírus que pertençam à mesma espécie dentro de um determinado género têm que codificar proteínas NS1 que mostrem >85% de identidade entre si ao nível da sequência de aminoácidos e que diverjam em >15% das proteínas codificadas por vírus de outras espécies (Cotmore *et al.*, 2014). Outros critérios anteriormente usados na classificação dos parvovírus, como sejam gama de hospedeiros, propriedades antigénicas e as características do genoma (*e.g.* estrutura dos telómeros, número de promotores e locais de poliadenilação, proteínas auxiliares codificadas) são ainda considerados.

1.5.2. Diversidade genética e evolução

Os diferentes géneros da subfamília *Parvovirinae* são geneticamente e biologicamente diversos. Os parvovírus caracterizam-se por taxas de substituição na gama de $1-2 \times 10^{-4}$ por posição nucleotídica por ano, a mais alta taxa de mutação entre os vírus com genoma DNA e comparável à dos vírus com genoma de ssRNA (Shackelton *et al.*, 2007; Duffy, Shackelton and Holmes, 2008; Kemenesi *et al.*, 2015). Por outro lado também são propensos a recombinação e estes dois factores são determinantes da evolução dos parvovírus (Ohshima and Mochizuki, 2008; Wang *et al.*, 2012; Berns and Parrish, 2013).

Os vírus incluídos nos géneros *Erythroparvovirus* e *Protoparvovirus* são altamente específicos de uma determinada espécie hospedeira e a filogenia destes vírus é congruente com a filogenia dos seus hospedeiros, sugerindo que estes parvovírus emergiram há muito tempo (Lukashov and Goudsmit, 2001; Sharp *et al.*, 2010). Tem sido sugerido que os parvovírus têm não só co-evoluído, como também co-divergido

com os seus hospedeiros mamíferos, o que implica que o ancestral comum deste grupo de vírus tem pelo menos 90 milhões de anos (Lukashov and Goudsmit, 2001; Sharp *et al.*, 2010). No entanto, o processo de co-divergência de vírus e hospedeiro tem sido pontuado por transmissões ocasionais entre espécies, de que é exemplo a disseminação para cães de um vírus do tipo vírus da panleucopenia felina (FPV), um parvovírus que afecta gatos, e causadora de uma pandemia em canídeos na década de 70 (Parrish, 1999; Sharp *et al.*, 2010).

Até agora foram identificados três genótipos divergentes (1-3) entre as estirpes de eritroparvovírus B19 humano, os genótipos 1 e 2 distribuem-se maioritariamente pela Europa e E.U.A., enquanto o genótipo 3 é mais prevalente na África Subsaariana e América do Sul (Sharp *et al.*, 2010). Os três genótipos divergem entre 5 e 20% na sequência nucleotídica e ainda podem apresentar diferentes subtipos (Berns and Parrish, 2013). Foi descrita uma sucessão temporal para os genótipos ao longo do tempo, nos anos 60 e 70 na Europa, em que o genótipo 1 do B19 substituiu em grande parte o genótipo 2 (Sharp *et al.*, 2010). Eritroparvovírus homólogos de B19 foram identificados em macaco-rhesus, macaco-cinómologo e macaco-rabo-de-porco, e vírus mais distintos foram descritos em esquilos e bovinos (Sharp *et al.*, 2010).

Segundo o último relatório publicado pelo ICTV, existem 6 espécies de tetraparvovírus e 9 genótipos, apenas uma das espécies infecta primatas, as restantes infectam bovinos, suínos, ovinos e morcegos (Cotmore *et al.*, 2014). Tal como para o vírus B19, PARV4 humano também apresenta três genótipos com distribuição geográfica distinta e com sucessão temporal dos genótipos em circulação (Sharp *et al.*, 2010). A diversidade genética dentro dos genótipos de PARV4 é baixa, sugerindo que a propagação de cada um deles ocorreu recentemente, possivelmente nos últimos 20-30 anos (Sharp *et al.*, 2010; Mathews *et al.*, 2014).

Os vírus homólogos de PARV4, identificados em primatas não-humanos mostram uma relação evolutiva mais próxima com vírus humanos do que com os homólogos que infectam suínos e bovinos, o que suporta a hipótese de co-evolução de vírus e hospedeiro (Sharp *et al.*, 2010). No entanto, é possível que os três genótipos representem diferentes transmissões zoonóticas de PARV4 para a população humana (Mathews *et al.*, 2014). Porém, num estudo recente realizado na Costa do Marfim, que

incluiu caçadores, chimpanzés e várias espécies de macacos relacionados em termos de predação, observou-se que as variantes do tipo PARV4 de primatas não humanos eram específicas da espécie de hospedeiro, apesar de haver várias oportunidades de transmissão, incluindo contacto de sangue dos vários primatas não humanos entre si e com os seus caçadores humanos (Adloch *et al.*, 2012).

Os primeiros bocavírus foram identificados em bovinos e esta designação, tal como o nome do género (*Bocaparvovirus*), reflecte os seus primeiros hospedeiros conhecidos (bovinos-caninos). Para além de bovinos e caninos, os bocavírus infectam primatas, morcegos, felinos, suínos e leões-marinhos (Cotmore *et al.*, 2014). Segundo o último relatório publicado pelo ICTV, existem doze espécies incluídas no género *Bocaparvovirus*. Duas destas espécies infectam primatas (*Primate Bocaparvovirus 1 and 2*) e incluem 4 genótipos de vírus humanos (HBoV1-4) e um de vírus que infectam gorilas (GBoV), correspondendo a um total de sete linhagens que infectam primatas [HBoV1 (DQ000496); HBoV2a (FJ973558), HBoV2b (FJ973560), HBoV2c (FJ170278); HBoV3 (EU918736); HBoV4 (FJ973561) e GBoV (HM145750)] (Cotmore *et al.*, 2014).

O bocaparvovírus humano 1 (HBoV1) apresenta, ao contrário dos outros genótipos de HBoV, um baixo nível de diversidade (Kapoor *et al.*, 2010a; Kapoor *et al.*, 2010b). O genótipo HBoV2 apresenta uma elevada diversidade genética sendo por isso ainda dividido em três linhagens genéticas HBoV2a, b e c (Kapoor *et al.*, 2009; Kapoor *et al.*, 2010b; Cotmore *et al.*, 2014; Tymmentsev *et al.*, 2016). Alguns estudos sugerem que HBoV3 seja um vírus recombinante com a região dos genes NS e NP1 tendo mais similaridade com a do genótipo 1 e o gene VP mais similaridade com o do genótipo 2 (Arthur *et al.*, 2009; Kapoor *et al.*, 2010b; Sharp *et al.*, 2010), enquanto outros autores defendem tratar-se de um vírus recombinante entre HBoV1 e HBoV4 (Cheng *et al.*, 2011 in Babkin *et al.*, 2013). Por outro lado HBoV4 também mostra evidências de recombinação, com o gene das proteínas não estruturais mais similar ao de HBoV2 e o gene das proteínas estruturais mais semelhante ao de HBoV3 (Kapoor *et al.*, 2010b). Outros estudos sugerem que também HBoV2 provém de um evento de recombinação entre HBoV1 e HBoV4 (Kapoor *et al.*, 2009; Kapoor *et al.*, 2010a; Fu *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2010 in Babkin *et al.*, 2013).

Os vírus homólogos de HBoV identificados em primatas não-humanos apresentam uma relação evolutiva mais próxima de vírus humanos do que das espécies hospedeiras que formaram o género (cães, bovinos), o que suporta a hipótese de co-evolução dos vírus e hospedeiros, tal como discutido para o vírus PARV4 (Sharp *et al.*, 2010). No entanto, as relações filogenéticas dos BoV identificados em grandes símios são complexas, com inconsistências na análise entre as regiões NS1 e VP2 que indicam também possíveis eventos de recombinação na história evolutiva dos bocavírus de primatas não-humanos (Sharp *et al.*, 2010). Sharp e colaboradores (2010) sugerem que os vírus identificados em chimpanzés e gorilas representam homólogos divergentes e separados de HBoV1, HBoV2 e HBoV3 (Sharp *et al.*, 2010). O que implicaria que o evento de recombinação que gerou o HBoV3 ocorreu antes de especiação dos símios, colocando a evolução dos bocavírus há 5 milhões de anos atrás, se seguirmos o modelo de co-evolução (Sharp *et al.*, 2010). No entanto, é necessária uma caracterização muito mais extensa do BoV de símios para fundamentar a hipótese de co-evolução (Sharp *et al.*, 2010).

O género *Protoparvovirus* inclui cinco espécies, uma que infecta carnívoros, uma de ungulados, duas de roedores e uma de primatas. Segundo o último relatório do ICTV (2013) a espécie *Primate protoparvovirus 1* inclui um grupo de vírus bem distintos, os bufavírus, com três variantes que infectam humanos [BuPV1a (JX027296); BuPV1b (JX027295); BuPV2 (JX027297)]. Mais recentemente foi descoberto um terceiro genótipo 3 no Butão [BuPV3 (AB847987)] (Yahiro *et al.*, 2014). Os bufavírus agrupam uma grande variedade de vírus, tendo sido descritos desde este último relatório novos bufavírus em diversas espécies de hospedeiros, incluindo primatas não humanos (Sasaki *et al.*, 2015), morcegos (Kemenesi *et al.*, 2015), raposas-voadoras (Sasaki *et al.*, 2016), musaranhos (Sasaki *et al.*, 2015), suínos (Hargitai *et al.*, 2016) e ratos (Yang *et al.*, 2015).

Desconhece-se a origem evolutiva dos bufavírus. No entanto, Kemenesi e colaboradores (2015) mostraram, através de análises filogenéticas, que bufavírus encontrados em morcegos podem ter tido um ancestral comum com bufavírus de humanos. Ainda, com base na análise de recombinação, foi identificado no genoma do bufavírus WUHARV de macaco-rhesus um evento de recombinação, na região codificante das proteínas estruturais, entre sequências genómicas de bufavírus de morcego e de bufavírus

humano, sugerindo que o vírus WUHARV possa ter resultado da recombinação entre bufavírus humanos e de morcegos (Handley *et al.*, 2012; Kemenesi *et al.*, 2015). Muito recentemente, foi identificado um outro bufavírus em raposas-voadoras (MgBuV1) cuja caracterização genética indicou uma evolução também marcada por múltiplos eventos de recombinação (Sasaki *et al.*, 2016). Foram identificadas incongruências filogenéticas que sugerem uma estrutura mosaico para o genoma de MgBuV1 incluindo fragmentos com maior similaridade com protoparvovírus de suíno (*porcine parvovirus Zsana*) (Hargitai *et al.*, 2016) e com o bufavírus identificado em macaco-rhesus (WUHARV) (Sasaki *et al.*, 2016). Estas descobertas implicam que o ancestral comum mais recente de MgBuV1 terá surgido de múltiplos eventos de recombinação e consequentemente que tenha ocorrido uma infecção simultânea com os ancestrais de MgBuV1, WUHARV e o protoparvovírus de suíno (Sasaki *et al.*, 2016). Estes últimos dados expandem um pouco o conhecimento acerca da evolução destes vírus e a história evolutiva partilhada entre bufavírus de primatas e morcegos é intrigante, nomeadamente a potencial transmissão zoonótica.

À semelhança do que acontece com os bufavírus, a recombinação foi igualmente descrita para outros protoparvovírus. Para MEV (*Mink enteritis virus*), um protoparvovírus que causa doença em martas, foi demonstrada evidência de recombinação com o protoparvovírus canino CPV em amostras recolhidas de martas na China (Wang *et al.*, 2012). Eventos frequentes de recombinação foram igualmente demonstrados para protoparvovírus de várias espécies de roedores, de suínos (PPV) e de martas (AMDV, *Aleutian mink disease*) (Shackelton *et al.*, 2007).

Recentemente foi também identificado um novo protoparvovírus numa criança com diarreia de etiologia desconhecida, denominado tusavírus (Phan *et al.*, 2014). A amostra colhida desta criança foi analisada e nenhum outro vírus de mamíferos foi detectado, sugerindo que este vírus pode ter tido um papel no desenvolvimento da patologia gastrointestinal observada (Phan *et al.*, 2014). A análise filogenética deste vírus indicou ser muito distinto dos vírus até agora incluídos no género (Phan *et al.*, 2014). Curiosamente, as proteínas NS1, VP1 e VP2 apresentavam maior semelhança, ainda que baixa, com as do protoparvovírus KRP (*Kilham rat parvovirus*), 44%, 39% e 37%,

respectivamente (Phan *et al.*, 2014). Foi então proposto que o tusavírus seja incluído numa nova espécie denominada *Primate protoparvovirus 2* (Phan *et al.*, 2014).

1.6. Epidemiologia dos parvovírus de transmissão fecal-oral

1.6.1. PARV4

Identificados pela primeira vez, em 2005, no sangue de um indivíduo consumidor de drogas por via intravenosa (IDU) infectado pelo vírus da hepatite B (HBV) (Jones *et al.*, 2005), parvovírus PARV4 ou anticorpos contra antígenos de PARV4 foram, subsequentemente, detectados em indivíduos de grupos de risco para infecções parentéricas (*e.g.* IDUs, transfusionados). Na Europa e E.U.A, a infecção por PARV4 surge frequentemente associada à infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite C (HCV) e/ou HBV (Simmons *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012).

Devido à elevada prevalência de anticorpos anti-PARV4 em indivíduos com histórico de risco de infecção parentérica foi sugerido que esta seja a principal via de transmissão de PARV4 em países desenvolvidos (Phan *et al.*, 2012; Matthews *et al.*, 2014; Väisänen *et al.*, 2014a). No entanto, a detecção de PARV4 em indivíduos que não apresentam factores de risco para a possível transmissão parentérica sugere outras vias de transmissão do vírus (Drexler *et al.*, 2012; Phan *et al.*, 2012; Matthews *et al.*, 2014). Um estudo em crianças com sintomas respiratórios e gastrointestinais em África, mostrou a presença de DNA de PARV4 em 0,5% e 0,8% das amostras nasais e fecais, respectivamente, sugerindo que possa ocorrer transmissão do vírus por via respiratória e/ou fecal-oral (Drexler *et al.*, 2012). Foi também documentada transmissão vertical placentária (Matthews *et al.*, 2014).

A infecção por PARV4 é geralmente assintomática e, apesar de haver alguns estudos que reportam patologias associadas, como sintomas respiratórios e gastrointestinais, hepatites, erupções cutâneas e encefalites, não há uma associação forte entre a infecção por PARV4 e estes sintomas (Matthews *et al.*, 2014).

Na sequência da descoberta de vírus PARV4 em humanos, vírus semelhantes foram descritos em suínos e bovinos (Lau *et al.*, 2008), chimpanzés e babuínos (Sharp *et al.*, 2010), morcegos (Canuti *et al.*, 2011) e ovelhas (Tse *et al.*, 2011).

1.6.2. HBoV

Os bocavírus humanos (HBoV) identificados pela primeira vez, em 2005, em secreções nasofaríngeas de crianças suecas com infecções no tracto respiratório (Allander *et al.*, 2005), foram subsequentemente associados a infecções respiratórias em todo o mundo. Para além de HBoV1 respiratório, entre 2009 e 2010, foram descritos três novos genótipos de bocavírus humanos, denominados HBoV2-4 (Arthur *et al.*, 2009; Kapoor *et al.*, 2009; Kapoor *et al.*, 2010b). A detecção destes últimos tem sido maioritariamente em amostras fecais e por isso são considerados HBoV entéricos.

De distribuição mundial, os HBoV são detectados em todos os grupos etários, mas a infecção ocorre mais frequentemente em indivíduos com idades entre os 6 e 24 meses, sendo esta associação mais forte para HBoV1 (Schildgen, 2013; Tong *et al.*, 2013; Berry, Gamiieldien and Fielding, 2015; Abdel-Moneim *et al.*, 2016; Ong, Schuurman and Heikens, 2016). Também a seroprevalência de HBoV está relacionada com a idade apresentando um valor médio estimado de 76,6% em crianças e 96% em adultos (Kantola *et al.*, 2011).

Um estudo de meta-análise (2005-2016) revelou que, dependendo do país analisado, a prevalência de DNA de HBoV em amostras do trato respiratório varia entre 1% e 56,8% e em amostras fecais entre 1,3% e 63%. E ainda, que a taxa de co-infecção com outros agentes patogénicos é de 52,4% nos indivíduos com doença respiratória e de 46,7% nos indivíduos com sintomas gastrointestinais (Guido *et al.*, 2016). Esta associação de HBoV a outros potenciais patogénios, a sua presença em indivíduos assintomáticos (Ong, Schuurman and Heikens, 2016), bem como a dificuldade em replicar estes vírus em culturas celulares ou ainda a inexistência de modelos animais de infecção, tem levado a questionar o seu papel como agente causador de doença. A recente demonstração de infecção produtiva e destruição de culturas primárias de células do epitélio respiratório suporta a associação clínica entre HBoV1 e doença respiratória (Dijkman *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2016).

Para além do Homem, os membros do género *Bocaparvovirus* infectam primatas não humanos, bovinos, canídeos, morcegos, felinos, suínos e leões-marinhos (Kapoor *et al.*, 2010a; Sharp *et al.*, 2010; Phan *et al.*, 2012; Cotmore *et al.*, 2014). No caso dos vírus de

bovinos e canídeos estão descritas morte fetal e doenças respiratórias e entéricas em animais jovens (Allander *et al.*, 2005).

1.6.3. BuV

Os bufavírus (BuV) foram identificados pela primeira vez em amostras de fezes de crianças com diarreia aguda do Burquina Faso (Phan *et al.*, 2012). Desde então, para além do Homem, já foram identificados bufavírus em amostras fecais de musaranhos (Sasaki *et al.*, 2015), ratos (Yang *et al.*, 2015), morcegos (Kemenesi *et al.*, 2015), raposas-voadoras (Sasaki *et al.*, 2016), suínos (Hargitai *et al.*, 2016) e primatas não humanos (Sasaki *et al.*, 2015; Handley *et al.*, 2012) mas sem indícios de causarem doença.

A infecção por BuV foi descrita tanto em crianças como em adultos com doença diarreica e com diferentes prevalências (0,27–4%) (Väisänen *et al.*, 2014a; Chieochansin *et al.*, 2015). Contrariamente ao genótipo 1 de BuV que parece ter uma distribuição global, tendo sido identificado em África (Phan *et al.*, 2012), Ásia (Phan *et al.*, 2012; Chieochansin *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015) e Europa (Väisänen *et al.*, 2014a; Smits *et al.*, 2014), o genótipo 2 de BuV apenas foi descrito no Burquina Faso (Phan *et al.*, 2012), enquanto o genótipo 3 foi detectado em três países asiáticos (Yahiro *et al.*, 2014; Altay *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015).

À semelhança dos bocavírus entéricos, ainda não é claro se os bufavírus têm envolvimento directo no desenvolvimento de patologias gastrointestinais, se agravam patologias subjacentes ou se simplesmente fazem parte do viroma humano. Esta última hipótese parece ser afastada pelos dados dos três estudos epidemiológicos em que foram incluídos indivíduos sem doença gastrointestinal e nos quais não foi possível detectar a presença de BuV (Altay *et al.*, 2015; Chieochansin *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015). No entanto, nestes estudos, a baixa prevalência (0,27%-1,4%) encontrada não permitiu considerar como significativa a associação à doença. O aumento da carga viral de BuV, ao longo do tempo, num doente com gastroenterite (Väisänen *et al.*, 2014a) e um maior número médio de dejectos diários nos doentes infectados por BuV comparativamente com diarreias por rotavírus ou norovírus (Altay *et al.*, 2015) são sugestivos de um papel etiológico em doenças gastrointestinais.

1.7. Objectivo

Apesar da descoberta dos bocavírus (BoV) e vírus PARV4 humanos ter ocorrido há cerca de uma década, à semelhança dos bufavírus (BuV) recentemente identificados, existe pouca informação disponível relativamente a patologias associadas, epidemiologia, relações filogenéticas e origem e evolução destes parvovírus. Particularmente existe um conhecimento muito limitado relativamente à infecção de primatas não humanos por vírus dos três géneros em que estes parvovírus humanos se incluem. Esta falta de informação deve-se, possivelmente, ao facto destes vírus poderem não estar associados a patologias graves ou surtos epidémicos.

O objectivo genérico deste estudo consistiu em detectar e caracterizar três parvovírus de potencial transmissão fecal-oral – PARV4, BoV, BuV – em amostras fecais de primatas não humanos em cativeiro no Jardim Zoológico de Lisboa. Para tal, foram estabelecidos os seguintes objectivos específicos:

- detectar os três parvovírus seleccionados através da amplificação por PCR de um segmento da região mais conservada do seu genoma, o gene NS1, usando como matriz DNA extraído de amostras fecais ou de culturas celulares inoculadas com as mesmas;
- sequenciar os fragmentos de DNA obtidos;
- realizar uma pesquisa de similaridade genética no programa BLAST para confirmar a amplificação de sequências de parvovírus; e
- analisar as relações filogenéticas entre os parvovírus identificados no decorrer do estudo e com os descritos na literatura através da construção de árvores filogenéticas, no sentido de abordar, ainda que de forma preliminar, a sua origem e evolução.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras

No contexto de um estudo de adenovírus de primatas não humanos, entre Outubro de 2014 e Janeiro de 2015, foram colhidas 128 amostras de fezes de um total de 35 espécies de símios em cativeiro no Jardim Zoológico de Lisboa, descritas no anexo 1. Resumidamente, analisaram-se 3 amostras de fezes de gorilas, 4 de orangotangos, 10 de chimpanzés, 6 de gibões, 48 de macacos do Velho Mundo, 40 de macacos do Novo Mundo e 17 de lémures. As amostras foram colhidas do chão dos alojamentos, de animais isolados ou em coabitação, e identificadas de acordo com a espécie de origem, não sendo possível identificar o indivíduo a que pertenciam. Não se colocaram questões éticas considerando o produto em causa e o procedimento de colheita.

As amostras de fezes foram diluídas em 5ml de tampão PBS (~10% p/v), homogeneizadas com recurso a esferas de vidro e agitação com vórtex, centrifugadas durante 15 minutos a 2500 x g. O sobrenadante foi filtrado usando um filtro de 0,2 µm com pré-filtro (*Sterile Acrodisc® Syringe Filters*, Pall Corporation, E.U.A.) para remoção de fungos e bactérias. Nos dias das colheitas, as amostras diluídas e filtradas foram inoculadas em culturas das linhas celulares A549 (amostras de grandes símios) e Vero (restantes amostras). Após uma semana de incubação, foi feita uma passagem cega e os extractos celulares totais desta última (3 ciclos de congelação e descongelação no meio de cultura) foram guardados a -80° C até serem usados.

No decorrer deste trabalho surgiu ainda a oportunidade de testar a presença de parvovírus noutras amostras fecais de mamíferos, nomeadamente de morcegos, musaranhos e roedores. As amostras recebidas no Grupo de Virologia, da Unidade de Microbiologia Médica do IHMT, no contexto de outros trabalhos em curso foram testadas relativamente à presença de DNA de bufavírus. A descrição das amostras, protocolos da extracção e amplificação de DNA, clonagem molecular e sequenciação estão descritos no anexo 6.

2.2. Extracção de DNA

Extraíu-se DNA a partir de 200 µl de sobrenadante da amostra fecal, ou de extractos totais de células inoculadas, usando o *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche, Alemanha) segundo as instruções do fabricante para isolamento de ácidos nucleicos a partir de sangue total de mamífero, camada leucoplaquetária ou culturas celulares. A um microtubo de 1,5 ml, com os 200 µl de suspensão fecal filtrada, foram adicionados 200 µl de tampão de ligação e 40 µl de proteinase K. Após homogeneização a mistura foi incubada 10 minutos a 70°C. Adicionaram-se 100 µl de isopropanol e, após uma nova homogeneização, a mistura foi transferida para a coluna de purificação acoplada a um tubo colector, seguiu-se uma centrifugação durante 1 minuto a 8000 x g e o tubo colector foi esvaziado. De seguida procedeu-se à lavagem da coluna, onde foram adicionados 500 µl de tampão de remoção de inibidores seguido de uma centrifugação durante 1 minuto a 8000 x g e esvaziamento do tubo colector, esta lavagem foi repetida e por fim foi feita uma nova centrifugação durante 10 segundos a 13000 x g para remoção do tampão de lavagem residual. Para a eluição do DNA foram adicionados à coluna, acoplada a um microtubo de 1,5ml, 200 µl de tampão de eluição pré-aquecido a 70°C, seguido de centrifugação durante 1 minuto a 8000 x g. O DNA foi guardado a -20°C.

2.3. Amplificação por nested PCR de uma sequência do gene NS1 de parvovírus

A presença de DNA de parvovírus nas amostras processadas foi testada por *nested* PCR usando *primers* degenerados para cada um dos géneros de parvovírus seleccionados (Tabela 1). Todas as reacções para amplificação de uma sequência do gene NS1 dos três géneros de parvovírus foram realizadas essencialmente nas mesmas condições.

A primeira reacção de *nested* PCR foi realizada usando 2 µl de cada *primer* externo (20 pmol/µl) descritos na Tabela 1, 10 µl de DNA matriz, 12,5 µl de *NZYTaq 2X Green MasterMix* (NZYTech, Portugal) e 3,5 µl de água destilada num volume total de 30 µl; para a segunda reacção do *nested* PCR foram usados 2 µl de cada *primer* interno (20 pmol/µl) descritos na Tabela 1, 3 µl de produto da primeira reacção de PCR, 12,5 µl de *NZYTaq 2X Green MasterMix* (NZYTech, Portugal) e 10,5 µl de água destilada num volume total de 30 µl. Para a segunda reacção do *nested* PCR de bufavírus foi utilizada uma mistura equimolar dos dois *primers* internos directos (BuVF2 e BuVF3).

Na Tabela 1 estão descritas as sequências dos diferentes *primers* usados, localização no genoma viral e tamanho do produto esperado. Os *primers* para detecção de PARV4 e bocavírus, bem como as condições de termociclagem, são os descritos por Sharp e colaboradores (2010). Os *primers* para detecção de bufavírus foram desenhados por Sasaki e colaboradores (2015).

O protocolo para ambas as reacções de PCR consistiu num passo de desnaturação inicial a 95°C, 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C (18 segundos), hibridação a 50°C (30 segundos) e extensão a 72°C (90 segundos); um passo de extensão final a 72°C durante 6 minutos.

Os produtos de *nested* PCR (5 µl) foram separados por electroforese em gel de agarose (1,5% p/v) em tampão TAE 0,5X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) com 0,5 µg/ml de brometo de etídio. Paralelamente, aplicou-se solução de marcador de tamanhos moleculares *Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, E.U.A). Os produtos de amplificação migraram durante 1,5 horas com uma corrente constante

de 85V, após o que foram visualizados por exposição a UV e captura de imagem com o equipamento Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories, E.U.A).

Tabela 1 – *Primers* utilizados nas reacções de amplificação de sequências NS1 de PARV4, bocavírus (BoV) e bufavírus (BuV). As coordenadas das sequências dos *primers* são relativas a sequências de referência dos parvovírus humanos HBoV3 (NC_012564); HBuV3 (NC_024888) e PARV4 G1 (NC_007018).

Parvovírus	Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'-3')	Localização no genoma	Tamanho expectável do amplicão
PARV4	PARV4os	TGAAYCAGACCTTGARCGSCC	2992-3012	534 pb
	PARV4oa	CCMCCHAWCCAYTGAGCTTTWACTTT	3500-3525	
	PARV4is	TAYAATTATGTTGGTCCTGGTAATCC	3041-3066	296 pb
	PARV4ia	GGTARRACCTGYGAWADTTGAACATC	3311-3336	
BoV	BOVos	AAYGGGCTKCCGCTKCYAGAAC	965-986	676 pb
	BOVoa	GRTGCATTAARCAITCYTCCCACC	1617-1640	
	BOVis	ATGGCCTWTGGRGGACGTGGT	1046-1066	533 pb
	BOVia	CCYTTGTTYARATGATTAACACASCC	1553-1578	
BuV	BUVF1	TCAAWRTMACCTGGAAAGACTACAGA	128-153	1342 pb
	BUVR1	TCATTGGTTGTCATKAYWACTGGAGTTGGTTC	1438-1469	
	BUVF2	AGAAAAATGGATGCTCCAAGATCCAGA	918-944	483 pb
	BUVF3	AGAAAAATGGATGCTTGGTGAWCCWGA		
	BUVR2	ATTGCTTGGCCACTCATGATKG	1379-1400	

2.4. Amplificação por PCR de uma sequência do gene VP1 de parvovírus

2.4.1. Bocavírus

Para as reacções de amplificação de uma sequência parcial do gene VP de BoV foram usados os *primers* OS-p18 e OAS-p19 para a primeira reacção de PCR e os *primers* IS-p12 e IAS-p13 para a segunda reacção de PCR (Tabela 2), descritos em Brožová e colaboradores (2016).

A composição das misturas de reacção foi a anteriormente descrita (secção 2.3.). As condições de amplificação foram: um passo de desnaturação inicial a 95°C, 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C (18 segundos), hibridação a 50°C (30 segundos) e extensão a 72°C (90 segundos); um passo de extensão final a 72°C durante 6 minutos.

Os amplicões foram separados por electroforese em gel de agarose (1% p/v) em tampão TAE 0,5X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) com 0,5 µg/ml de brometo de etídio. Paralelamente, aplicou-se solução de marcador de tamanhos moleculares *NZYDNA Ladder VI* (NZYTech, Portugal). Os produtos de amplificação migraram durante 1,5 horas com uma corrente constante de 85V, após o que foram visualizados por exposição a UV e captura de imagem com o equipamento Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories, E.U.A.).

2.4.2. Bufavírus

Os *primers* para a reacção de amplificação da sequência VP1 de BuV (BuVP1F e BuVP1R) estão descritos na Tabela 2. O desenho destes *primers* foi efectuado com base no alinhamento de múltiplas sequências nucleotídicas de bufavírus disponíveis na base de dados NCBI *nucleotide*. O alinhamento múltiplo foi feito com as sequências de BuV1a (JX027295), BuV1b (JX027296), BuV2 (JX027297), BuV3 (AB847989), WUHARV (JX627576) e Mpulung (AB93798) e permitiu seleccionar, entre as sequências analisadas, as zonas mais conservadas do gene VP1.

A composição da mistura de reacção foi como atrás descrita (secção 2.3.) para a primeira reacção de *nested* PCR, excepto a utilização de 5 µl de DNA matriz num

volume total de 25 µl. As condições de termociclagem consistiram num passo de desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 94°C (18 segundos), hibridação a 55°C (30 segundos) e extensão a 72°C (60 segundos); e um passo de extensão final a 72°C durante 6 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados como descrito na secção anterior para os bocavírus (secção 2.4.1.).

Tabela 2 – *Primers* utilizados nas reacções de amplificação de sequências VP1 de bocavírus (BoV) e bufavírus (BuV). As coordenadas das sequências dos *primers* são relativas às sequências de referência dos parvovírus humanos HBoV3 (BoV, NC_012564) e HBuV3 (BuV, NC_024888).

Parvovirus	Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'-3')	Localização no genoma	Tamanho expectável do fragmento amplificado
BoV	OS-p18	GGGATGAGGTTTACCGTATGC	2918-2938	1330 pb
	OAS-p19	CTTGAGTGTTCCGTTTCTTCTG	4225-4247	
	IS-p12	GGAAATGCTTTCTGCTGCTGAA	2988-3009	1177 pb
	IAS-p13	GCTCTTTCATTGTTAACCCATTCA	4141-4164	
BuV	BUVP1F	GTGGAGGTGGAAGCGGTGTCGGGCAC	2876-2901	979 pb
	BUVP1R	CCTGGATTGACTACAGGACCTCCTGTTG	3827-3854	

2.5. Purificação dos produtos de PCR

Foram utilizados dois sistemas comerciais para a purificação das moléculas de DNA amplificadas por PCR. Os produtos de PCR consistindo essencialmente numa banda com o tamanho expectável foram purificados usando o kit de purificação de DNA *Zymoclean DNA Clean Kit* (ZYMORESEARCH, EUA). Num microtubo de 1,5 ml colocou-se 20 µl do produto de PCR, 80 µl de água destilada e 500 µl de tampão de ligação de DNA. A mistura foi transferida para uma coluna *Zymo-SpinTM* com um tubo colector acoplado, centrifugada durante 30 segundos (16000 x g) e o tubo colector foi esvaziado. Foram feitas duas lavagens em que foram adicionados 200 µl de tampão de lavagem à coluna, esta foi centrifugada durante 30 segundos e o tubo colector foi esvaziado. O DNA foi eluído para um novo microtubo, por centrifugação, em 10 µl de tampão de eluição.

Para as restantes amostras, que apresentavam bandas inespecíficas para além da banda com o tamanho expectável correspondente ao fragmento desejado, o produto foi purificado após separação electroforética em gel de agarose com o kit de recuperação de DNA em gel *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* (ZYMORESEARCH, EUA). Foi excisada uma fatia do gel de agarose preparativo, que continha o fragmento de DNA pretendido, e transferida para um tubo. A cada volume de agarose excisada foram adicionados três volumes de solução ADB (*Agarose Dissolving Buffer*) fornecida com o kit, a que se seguiu incubação a 50°C até o fragmento de gel estar completamente dissolvido (5-10 minutos). A mistura foi então transferida para uma coluna (*Zymo-SpinTM Column*) com um tubo colector acoplado, centrifugada durante 1 minuto (16000 x g) e o tubo colector esvaziado. Foram feitas duas lavagens da coluna com 200 µl de tampão de lavagem e centrifugação durante 30 segundos (16000 x g). O DNA foi eluído para um novo microtubo, por centrifugação, em 10 µl de tampão de eluição.

A análise do resultado das purificações foi efectuada por electroforese em gel de agarose como anteriormente descrito.

2.6. Clonagem molecular

A utilização de *primers* degenerados e de temperaturas de hibridação relativamente baixas nas reacções PCR a partir de amostras fecais e extractos celulares totais resultaram, frequentemente, em produtos de amplificação inespecíficos, inclusivamente com a mesma dimensão do amplicão esperado, sendo necessário proceder à clonagem molecular para obtenção de cromatogramas de boa qualidade. Assim, produtos de PCR relativos aos fragmentos NS e VP de diferentes parvovírus foram clonados no vector plasmídico *pGEM[®]-T Easy Vector System I* (Promega, EUA). Este plasmídeo, fornecido na forma de vector linearizado, apresenta na extremidade 3' de ambas as cadeias um nucleosídeo timidina desemparelhado (Figura 4). Estes dificultam a circularização do vector durante a reacção de ligação e aumentam a eficácia da ligação dos produtos de PCR amplificados com Taq DNA polimerase, se esta adicionar um resíduo desoxiadenosina à extremidade 3' do DNA sintetizado. Este vector possui o local de inserção dos produtos de PCR inserido numa região de clonagem múltipla que, por sua vez, está ladeada pelos promotores de transcrição T7 e SP6 (Figura 4). Por outro lado, o local de inserção do produto de PCR situa-se na região que codifica a porção α da enzima da β -galactosidase (*lacZ*) de modo que, quando ocorre a inserção de um fragmento de DNA nesta região, a β -galactosidase fica inactiva, permitindo a selecção de recombinantes que surgem como colónias brancas em meio contendo IPTG e X-Gal. O vector contém o gene *bla* que confere resistência à ampicilina, indicado por Amp^r, e também inúmeros locais de restrição no local de clonagem múltipla, sendo possível libertar o inserto através de uma restrição com duas enzimas diferentes ou unicamente com uma enzima, de três possíveis, BstZI, EcoRI ou NotI (Figura 4).

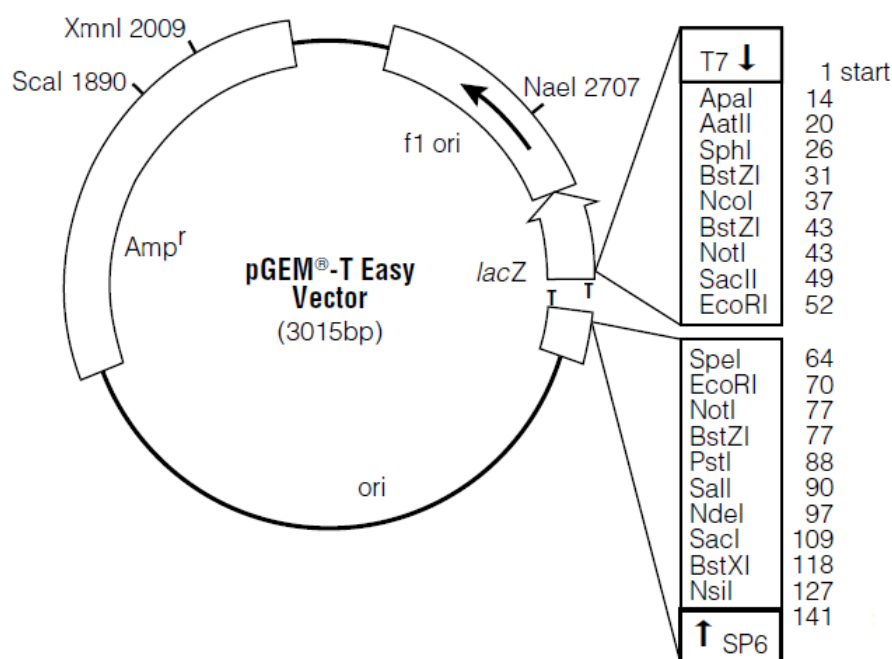


Figura 4 – Mapa físico do vector de clonagem *pGEM®-T Easy* (Promega, EUA) com algumas características importantes assinaladas, *e.g.* os promotores de transcrição T7 e SP6, o local de clonagem múltipla, os vários locais de restrição e o gene *bla* (Amp^r). (Adaptado de www.promega.com)

2.6.1. Ligação de um fragmento de DNA ao vector *pGEM®-T Easy*

As misturas de ligação foram feitas com recurso ao kit *pGEM®-T Easy Vector System I* (Promega, EUA). A mistura consistiu em 5 µl de tampão de ligação, 0,5 µl de plasmídeo *pGEM®-T Easy*, 1 µl de DNA ligase e 3,5 µl do produto de PCR purificado. A ligação decorreu durante a noite a 4°C.

2.6.2. Transformação de *E.coli* JM109

A estirpe bacteriana *E. coli* JM109 [recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rK⁻, mK⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB)], [F', traD36, proAB, lacI^qZΔM15] foi usada para transformação e obtenção de clones recombinantes.

Para a preparação de células *E. coli* JM109 competentes, 20 ml de meio de cultura LB líquido (Luria-Bertani, 1% Bactotripton, 0,5% extracto de levedura, 1% NaCl) foram inoculados com 200 µl de uma cultura bacteriana saturada, seguido de incubação a 37°C

com agitação (210 rpm) até a nova cultura atingir uma densidade óptica a 600 nm de 0,4-0,5.

A cultura foi então centrifugada a 4°C, 10 minutos (3300 x g). Após rejeição do sobrenadante, o sedimento foi ressuscitado em 1 ml de TSS (*Transformation and Storage Solution*, 5% DMSO, 50 mM MgSO₄, 10% PEG 6000 em LB) arrefecido em gelo.

Para a transformação, a um microtubo com 100 µl da suspensão bacteriana adicionou-se 5 µl da mistura de ligação obtida. Processou-se paralelamente 100 µl da suspensão de células competentes como controlo das células não transformadas.

As suspensões celulares foram mantidas em gelo durante 30 minutos e depois submetidas a um choque térmico num banho-maria a 42°C, durante 90 segundos, e novamente transferidas para gelo durante 5 minutos.

À suspensão foram adicionados 900 µl de meio LB líquido, seguindo-se uma incubação de aproximadamente 1 hora, a 37 °C, com agitação suave (75 rpm) para recuperação das células e expressão da marca de resistência.

Semearam-se então 100 µl das células transformadas em placas de Petri com LB sólido (1,5% de agar em LB) selectivo contendo ampicilina (100 µg/ml), IPTG (168 µM) e X-gal (40µg/ml), sendo feitas duas réplicas por cada transformação. A restante cultura foi centrifugada durante 1 minuto a 16000 x g, o sobrenadante foi parcialmente decantado, o sedimento ressuscitado no meio residual (~100 µl) e semeado como anteriormente. Todas as placas foram incubadas durante a noite a 37°C, incluindo uma placa controlo apenas com LB sólido selectivo.

2.6.3. Identificação de clones recombinantes

A transformação com o plasmídeo confere às bactérias resistência à ampicilina, este antibiótico é assim utilizado como agente de selecção. A selecção das colónias bacterianas transformadas com plasmídeos recombinantes, ou seja com um inserto, é baseada na α -complementação do gene da beta-galactosidase. Quando o inserto não está inserido no plasmídeo, o gene LacZ expressa a fracção α (alfa) da β -galactosidase, que, quando complementada com a fracção Ω (ómega) desta enzima expressa pela bactéria,

hidrolisa o substrato cromogénico X-gal que se converte num corante azul e confere essa cor às colónias. Na presença do inserto, a sequência nucleotídica da fracção alfa da β -galactosidase é interrompida e, conseqüentemente, não ocorre α -complementação do gene da β -galactosidase, o composto X-gal não é hidrolisado e as colónias apresentam um fenótipo branco.

Sempre que existentes, 6 colónias brancas por cada transformação foram transferidas para aproximadamente 2,5 ml de meio LB líquido com ampicilina (100 μ g/ml), deixadas a crescer durante a noite a 37°C com agitação (210 rpm) e extraído o DNA plasmídico pelo método de lise alcalina para subsequente identificação de clones recombinantes de interesse.

2.6.4. Extração de DNA plasmídico

Cerca de 2 ml das culturas obtidas na secção anterior foram centrifugados durante 15 minutos (16000 x g), o sobrenadante rejeitado e o sedimento celular ressuspensionado em 300 μ l de tampão TEG [25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1% glucose]. Adicionou-se então 300 μ l de solução de lise (200 mM NaOH, 1% SDS) com inversão suave do tubo para promover a lise bacteriana e mantendo os tubos em gelo.

Para neutralização do pH do lisado celular foram adicionados 300 μ l de solução de acetato de potássio 3M (pH 5,2) misturando por inversão e mantendo os tubos em gelo. Seguiu-se uma centrifugação durante 15 minutos (16000 x g) e o sobrenadante contendo as moléculas de DNA plasmídico foi transferido para tubos com 0,7 volumes de isopropanol para promover a precipitação dos ácidos nucleicos. Após mistura por inversão os tubos foram novamente centrifugados durante 30 minutos (13000 rpm) e o sobrenadante rejeitado.

A lavagem do sedimento foi feita com 500 μ l de etanol a 70% para remoção de sais e, após um vortex suave, procedeu-se a nova centrifugação durante 10 minutos (16000 x g).

O sobrenadante foi descartado e os ácidos nucleicos precipitados foram secos sob vácuo, ressuspensos em 30 μ l de TE [10 mM Tris (pH 7,5), 0,5M EDTA] suplementado

com RNase (50 µg/ml) e incubados 90 minutos a 37°C para degradação do RNA presente.

2.6.5. Digestão enzimática do DNA plasmídico

Para identificar os plasmídeos recombinantes com o inserto da dimensão de interesse, procedeu-se à digestão do DNA plasmídico extraído. A uma mistura de reacção contendo 1 µl da enzima EcoRI (10 unidades/ µl; Fermentas, Portugal), 2 µl de tampão EcoRI 10X (Fermentas) e 15 µl de água destilada, adicionou-se 2 µl de DNA plasmídico perfazendo um volume total de 20 µl. A hidrólise do DNA plasmídico decorreu durante a noite, em banho-maria a 37°C.

Os produtos da digestão foram separados por electroforese em gel de agarose (1,5% p/v) em tampão TAE 0,5X com 0,5 µg/ml de brometo de etídio. Paralelamente, aplicou-se solução de marcador de tamanhos moleculares e os produtos migraram durante 1,5 horas com uma corrente constante de 85V, após o que foram visualizados por exposição a UV e captura de imagem com o equipamento Gel Doc™ XR+ (*Bio-Rad Laboratories*, E.U.A.).

2.6.6. Purificação de DNA plasmídico

Quando possível, DNA plasmídico de 2 clones, possuindo o inserto com o tamanho de interesse, foi purificado para posterior sequenciação. Para tal, usou-se o sistema comercial de purificação de DNA *Zymoclean DNA Clean Kit* (ZYMORESEARCH, EUA) como descrito anteriormente (secção 2.5.). A análise do resultado das purificações foi efectuada por electroforese em gel de agarose (1% p/v) e visualização do perfil de migração como descrito.

2.7. Sequenciação de DNA

As reacções de sequenciação de DNA foram realizadas pela empresa de biotecnologia STABVIDA (Caparica, Portugal) pelo método de Sanger (Sanger, Nicklen and Coulson, 1977). As reacções de sequenciação dos produtos de PCR foram efectuadas num sentido, usando os *primers* internos previamente utilizados nas reacções de PCR. Para sequenciação dos produtos de PCR correspondentes ao fragmento NS de bocavírus foi utilizado o *primer* BoVis. Para a sequenciação dos produtos de PCR correspondentes ao fragmento NS de bufavírus foi utilizado o *primer* BuVR2, ambos descritos na Tabela 1.

As reacções de sequenciação do inserto de DNA plasmídico recombinante foram realizadas usando o *primer* universal T7, complementar de uma sequência flanqueante do local de clonagem múltipla do plasmídeo utilizado.

2.8. Análise bioinformática de sequências nucleotídicas

2.8.1. Análise de cromatogramas e edição de sequências

Os resultados da sequenciação obtidos na forma de cromatograma foram analisados e editados com recurso ao programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.2.5. A análise dos cromatogramas e edição manual das sequências nucleotídicas consistiu na verificação de possíveis discrepâncias entre os dois, nomeadamente a presença de um pico no cromatograma mas ausência da base corresponde na sequência nucleotídica ou o oposto, regiões com sobreposição de picos no cromatograma, e a identificação e remoção da região da sequência correspondente aos *primers* ou ao plasmídeo utilizado.

2.8.2. Análise bioinformática de sequências nucleotídicas

Após a edição das sequências nucleotídicas, estas foram analisadas com a ferramenta BLASTn (*Basic Alignment Search Tool*) disponibilizada no servidor do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), para pesquisa de similaridade entre as sequências obtidas no decurso deste trabalho e as sequências depositadas em bases de dados. Esta análise permitiu excluir sequências sem similaridade com as pretendidas de parvovírus.

2.8.3. Análise filogenética de sequências de DNA de parvovírus

O alinhamento das sequências nucleotídicas obtidas neste trabalho foi realizado com recurso ao programa MAFFT (disponível em www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/), e posteriormente editados manualmente no programa *BioEdit*, versão 7.2.5. Para a análise das relações filogenéticas entre as sequências obtidas no decorrer deste trabalho e as sequências já depositadas nas bases de dados, as árvores filogenéticas foram construídas com recurso ao programa MEGA, versão 5 (Tamura *et al.*, 2011), pelo método Neighbour-Joining (Saitou and Nei, 1987), utilizando para o cálculo de matrizes de distâncias genéticas o método Kimura, com 2 parâmetros (Kimura, 1980). Foi avaliada a robustez das topologias sugeridas através do método de *bootstrapping* (Felsenstein, 1985), com 1000 réplicas, sendo considerados estatisticamente significativos os valores iguais ou superiores a 70%.

As sequências nucleotídicas são apresentadas na árvore filogenética com a designação do parvovírus em estudo, seguido do nome comum da espécie onde este foi detectado, o local onde as amostras foram recolhidas (ZLX, Zoo de Lisboa) e por fim o número correspondente ao atribuído à amostra (Anexo 2). PTM designa sequências com origem em amostras fecais de morcegos, de espécie desconhecida, colhidas em Portugal.

3. Resultados

3.1. Detecção de parvovírus por PCR

Foram analisadas 128 amostras fecais de primatas não humanos em cativeiro no Jardim Zoológico de Lisboa (descritas no anexo 1), colhidas entre Outubro de 2014 e Janeiro de 2015, relativamente à presença do genoma de parvovírus, designadamente PARV4, BoV e BuV. A detecção de DNA de parvovírus foi feita por *nested* PCR usando *primers* desenhados com base em regiões de consenso e maioritariamente degenerados no sentido de aumentar a sensibilidade da detecção.

3.1.1. PARV4

O protocolo inicialmente aplicado nas reacções de PCR para amplificação de DNA do gene NS1 de PARV4 utilizou as condições e os *primers* desenhados por Sharp e colaboradores (2010) com base em alinhamentos do gene NS1 de vírus PARV4 humanos e de vírus tipo PARV4 identificados em bovinos e ovinos. Na figura 5 está apresentado um padrão típico dos produtos de amplificação obtidos para a primeira e segunda reacção de PCR. É evidente, nas duas reacções, um perfil complexo de produtos de amplificação com bandas de múltiplos tamanhos para além das bandas com o tamanho esperado (~534 pb e ~296 pb, respectivamente na 1ª e 2ª reacção). Curiosamente, estas últimas não se revelaram particularmente fortes e podem surgir nos dois perfis. É disto exemplo o amplicão de ~296 pb que nas amostras 27-30 surge tanto como produto da 1ª como da 2ª reacção de PCR (Figura 5).

No sentido de reduzir a inespecificidade observada, tentou-se otimizar o protocolo reduzindo a quantidade de produto de PCR transferido da 1ª para a 2ª reacção (3 µl para 1 µl), aumentando o número de ciclos para 45 na segunda reacção, reduzindo a temperatura de hibridação para 44°C, realização de uma segunda amplificação do produto de PCR da primeira reacção novamente com os *primers* externos para aumentar a quantidade de produto da 1ª reacção. Nenhuma das alterações resultou num aumento da especificidade ou da sensibilidade da amplificação (dados não apresentados).

Com base no padrão de migração electroforética do produto de *nested* PCR, em que foi visível uma banda de ~296 pb resultante da segunda reacção, obteve-se uma taxa de detecção de PARV4 de 13,3% (17/128) mas tornando-se óbvia a necessidade de sequenciar estes produtos para confirmar a sua identidade. As amostras potencialmente

positivas eram provenientes essencialmente de babuínos (8/10), estando as restantes dispersas pelos diferentes grupos de símios analisados, com excepção dos grandes símios (Anexo 2).

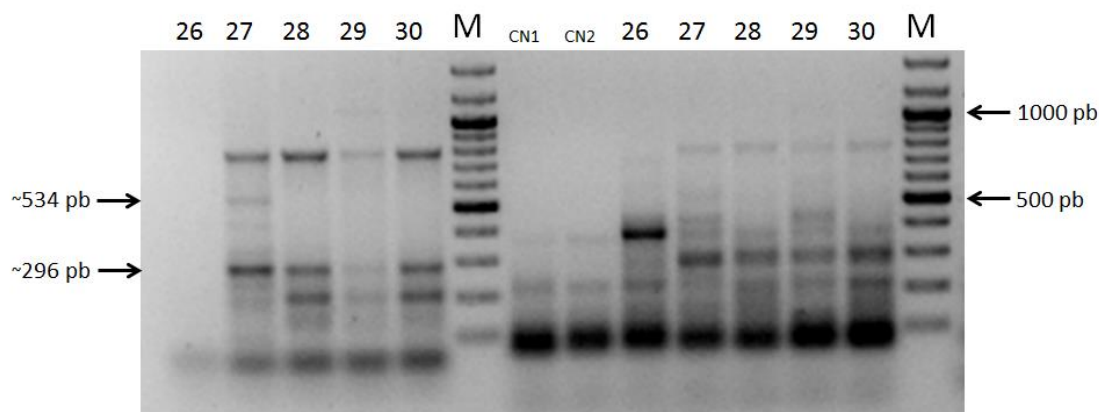


Figura 5 - Detecção de PARV4 nas amostras fecais símias 26-30. Produtos da amplificação por *nested* PCR de parte do gene NS1 após separação em gel de 1,5% de agarose. Pistas 1-5: produtos da 1ª reacção; Pistas 9-13: Produtos da 2ª reacção; CN1- Controlo negativo da 1ª reacção; CN2- Controlo negativo da 2ª reacção. Estão indicadas as dimensões dos produtos esperados na 1ª (~534 pb) e 2ª reacções de PCR (~296 pb). M- Marcadores de tamanho molecular *Gene Ruler™ 100pb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, E.U.A); pb- pares de bases.

3.1.2. Bocavírus

A detecção do genoma de bocavírus em amostras fecais de símios foi realizada segundo o protocolo de *nested* PCR de Sharp e colaboradores (2010) em que foram utilizados *primers* desenhados com base nos alinhamentos das sequências nucleotídicas de NS1 de HBoV1 e HBoV2. A título exemplificativo, na figura 6 estão apresentados perfis de migração de produtos da segunda reacção com origem em amostras de macaco-do-japão (Figura 6a) e de chimpanzés (Figura 6b). No primeiro caso, bandas com a dimensão esperada (~533 pb) surgem pouco intensas dentro do padrão de bandas inespecíficas, enquanto no segundo caso, apesar de ser evidente alguma inespecificidade, surgem bandas muito intensas com o tamanho pretendido. Para as primeiras amostras, no

sentido de obter enriquecimento no produto com o tamanho de interesse, procedeu-se ao aumento da temperatura de hibridação (de 50 para 55°C) mas sem sucesso (dados não apresentados).

No total, foram identificadas 38 amostras que deram origem a uma banda do tamanho esperado, correspondendo a uma taxa de detecção presuntiva de 29,7%, distribuídas maioritariamente por chimpanzés (7/10), lémures (9/17) e macacos do Velho Mundo (15/48) (Anexo 2).

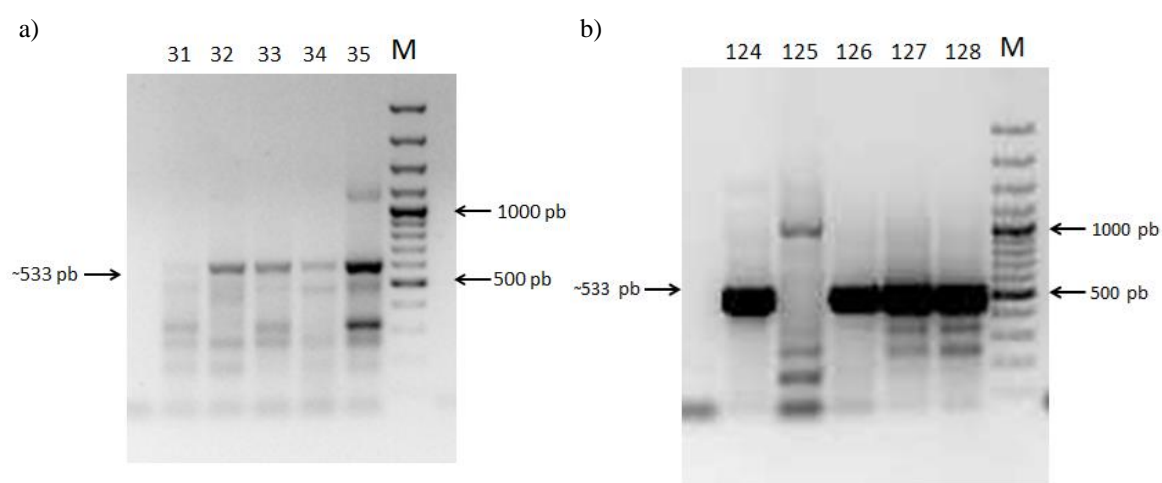


Figura 6 - Detecção de BoV nas amostras fecais símias 31-35 (a), 124-128 (b). Produtos de amplificação por *nested* PCR de parte do gene NS1 após separação em gel de 1,5% de agarose. Está indicada a dimensão do produto esperado na 2ª reacção de PCR (~533 pb). M- Marcadores de tamanho molecular *Gene Ruler™ 100pb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, E.U.A); pb- pares de bases.

Com o objectivo de aumentar a sensibilidade da detecção de bocavírus e detectar potenciais vírus recombinantes, testou-se ainda a amplificação de uma sequência nucleotídica do gene VP1 baseada no protocolo de Brožová e colaboradores (2016). As reacções de PCR usaram como matriz DNA proveniente de duas amostras (124 e 126) onde previamente tinha sido obtido, e confirmado por sequenciação, um produto específico abundante como sendo do gene NS1 de bocavírus.

Os melhores resultados foram obtidos com apenas uma reacção de amplificação usando os *primers* externos OS-p18 e OAS-p19 (Tabela 2), com o passo de extensão a 68°C durante 2,5 minutos, como descrito em Brožová e colaboradores (2016), resultando num fragmento de ~1330 pb. No entanto, o padrão de migração dos fragmentos resultantes revelou inespecificidade da amplificação (Figura 7).

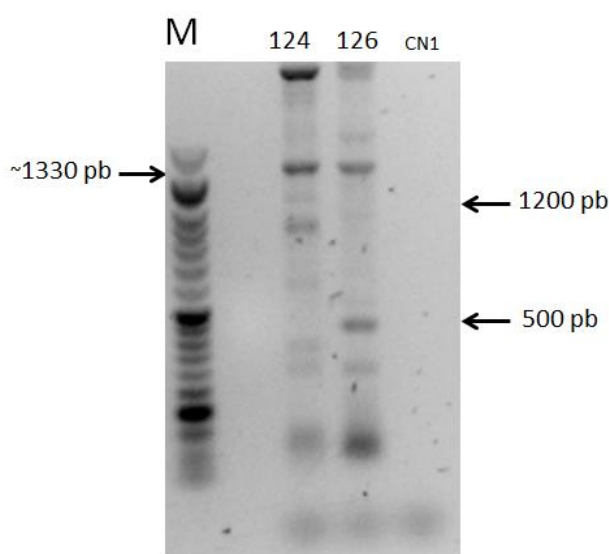


Figura 7 - Detecção de BoV nas amostras fecais símiás 124, 126. Amplificação por *nested* PCR de parte do gene VP1, 1ª reacção de PCR após separação em gel de 1,5% de agarose. Está indicada a dimensão dos produtos esperados na 1ª reacção de PCR (~1330 pb). M- Marcador de tamanho molecular - *NZYDNA Ladder VI* (NZYTech, Portugal); pb- pares de bases; CN1- Controlo negativo da primeira reacção.

3.1.3. Bufavírus

Contrariamente ao observado para a detecção de DNA do gene NS1 de PARV4 e bocavírus, a amplificação por *nested* PCR de uma sequência parcial do gene NS1 de bufavírus, baseada no protocolo e *primers* de Sasaki e colaboradores (2015), originou produtos específicos e abundantes de ~483 pb após a segunda reacção de PCR, como exemplificado nas figuras 8 e 9. No total, 22 das 128 amostras analisadas revelaram a presença do amplicão esperado, correspondendo a uma taxa de detecção presuntiva de

bufavírus de 17,2%. As amostras positivas correspondiam maioritariamente a grandes símios, designadamente chimpanzé-comum (8/10), e a seis espécies de macacos do Velho Mundo (11/48) (Anexo 2).

Com o objectivo de detectar potenciais vírus recombinantes e aumentar a sensibilidade da detecção de bufavírus, foi testada a amplificação de uma sequência nucleotídica correspondente a uma fracção do gene VP1. As reacções de PCR usaram como matriz DNA proveniente de várias amostras onde previamente tinha sido confirmada por sequenciação a presença de uma fracção do gene NS1 de bufavírus. Com o protocolo inicial de amplificação, testado nas amostras 122, 123 e 128, não houve amplificação de qualquer fragmento com o tamanho desejado.

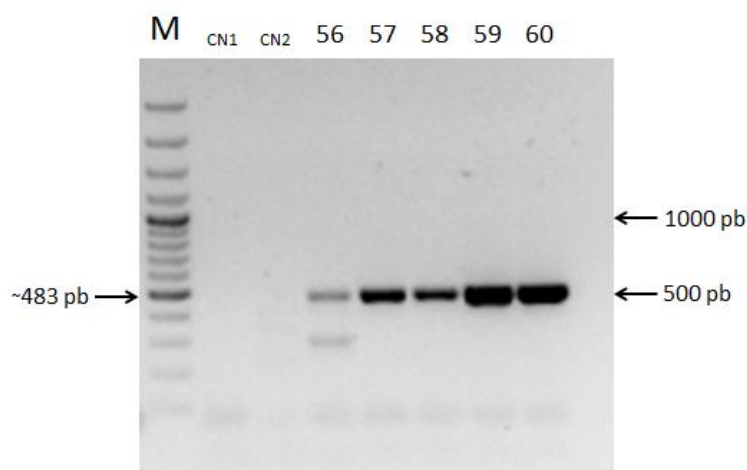


Figura 8 - Detecção de BuV nas amostras fecais símias 56-60. Amplificação por *nested* PCR de parte do gene NS1 após separação em gel de 1,5% de agarose, está indicada a dimensão do produto esperado na 2ª reacção de PCR (~483 pb). M- Marcador de tamanho molecular *Gene Ruler™ 100pb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, E.U.A); pb- pares de bases; CN1- Controlo negativo da 1ª reacção; CN2- Controlo negativo da 2ª reacção.

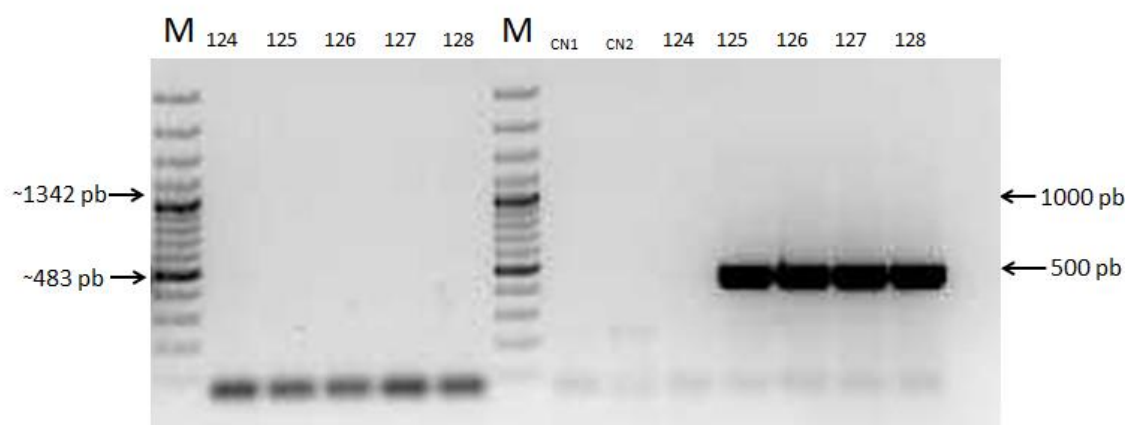


Figura 9 - Detecção de BuV nas amostras fecais símias 124-128. Amplificação por *nested* PCR de parte do gene NS1 após separação em gel de 1,5% de agarose. Pistas 2-6: amplicões da 1ª reacção; pistas 10-14 amplicões da 2ª reacção. Estão indicadas as dimensões dos produtos esperados na 1ª (~1342 pb) e 2ª reacção de PCR (~483 pb). M- Marcadores de tamanho molecular *Gene Ruler™ 100pb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, E.U.A); pb- pares de bases; CN1- Controlo negativo da 1ª reacção; CN2- Controlo negativo da 2ª reacção.

Foram então efectuadas algumas alterações ao protocolo de PCR, os melhores resultados foram obtidos com dois protocolos. No primeiro o aumento da temperatura de hibridação (de 55°C para 68°C) e o aumento do tempo de extensão (de 60 para 90 segundos); no segundo com o passo de desnaturação inicial mais longo (de 5 para 6 minutos), a redução do número de ciclos de amplificação (de 40 para 35), redução da temperatura de hibridação (de 55°C para 50°C) e aumento do tempo de extensão (de 60 para 90 segundos). O primeiro (testado nas amostras 54, 55, 58, 122) resultou na amplificação de fragmentos de tamanho de ~979 pb nas amostras 55 e 122; o segundo, (testado nas amostras 35, 52, 54, 55, 57, 58, 61) resultou na amplificação do fragmento desejado nas amostras 35, 54 e 58. No entanto, o padrão de migração dos fragmentos revelava amplificação inespecífica. Após a purificação destes fragmentos, verificou-se que apresentavam pouca quantidade de DNA. Numa tentativa de aumentar a quantidade foi realizada uma nova reacção de PCR usando como matriz 5µl do DNA já purificado

com o protocolo descrito acima (35 ciclos). O resultado desta amplificação é apresentado na figura 10.

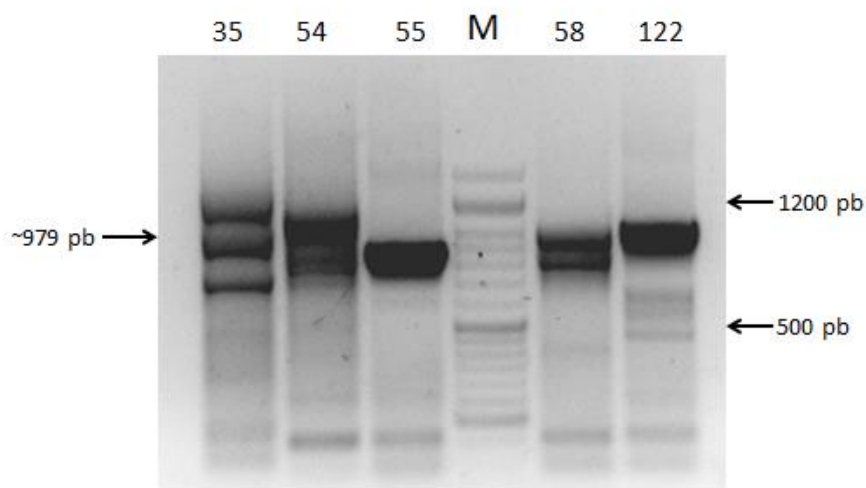


Figura 10 - Detecção de BuV em amostras fecais símias. Produtos de PCR de parte do gene VP1 após separação em gel de 1% (p/v) de agarose. Está indicada a dimensão do produto de PCR esperado (~979 pb). M- Marcador de tamanho molecular *NZYDNA Ladder VI* (NZYTech, Portugal); pb- pares de bases.

3.1.4. Replicação de bocavírus e bufavírus em culturas celulares

Com a finalidade de avaliar a replicação de bocavírus em linhas celulares contínuas inoculadas com suspensões fecais filtradas, seleccionaram-se extractos celulares totais previamente obtidos, relativos a cinco amostras de chimpanzé que tinham resultado em amplicões específicos e abundantes, e testaram-se para DNA viral segundo o protocolo usado nas amostras fecais. Como se observa na figura 11a, não foi amplificado qualquer fragmento de DNA com o tamanho esperado, sendo o perfil electroforético idêntico para as culturas inoculadas e não inoculadas (CC) com suspensões fecais. Relativamente aos bufavírus procedeu-se à amplificação a partir de extractos celulares totais resultantes da inoculação de 16 amostras que tinham previamente dado origem a amplicões com o tamanho pretendido. Algumas destes, tinham inclusivamente sido

confirmados por sequenciação como tendo similaridade com sequências de bufavírus depositadas nas bases de dados. Como se pode verificar na figura 11b, o padrão de migração dos produtos de PCR derivados de extractos de culturas inoculadas e não inoculadas (CC) é muito semelhante e, com excepção da amostra 122, revela bastante inespecificidade da amplificação. No perfil electroforético correspondente à amostra 122 é evidente uma banda com ~483 pb, bastante intensa, fortemente sugestiva da presença de DNA viral e replicação de bufavírus, a confirmar subsequentemente por sequenciação.

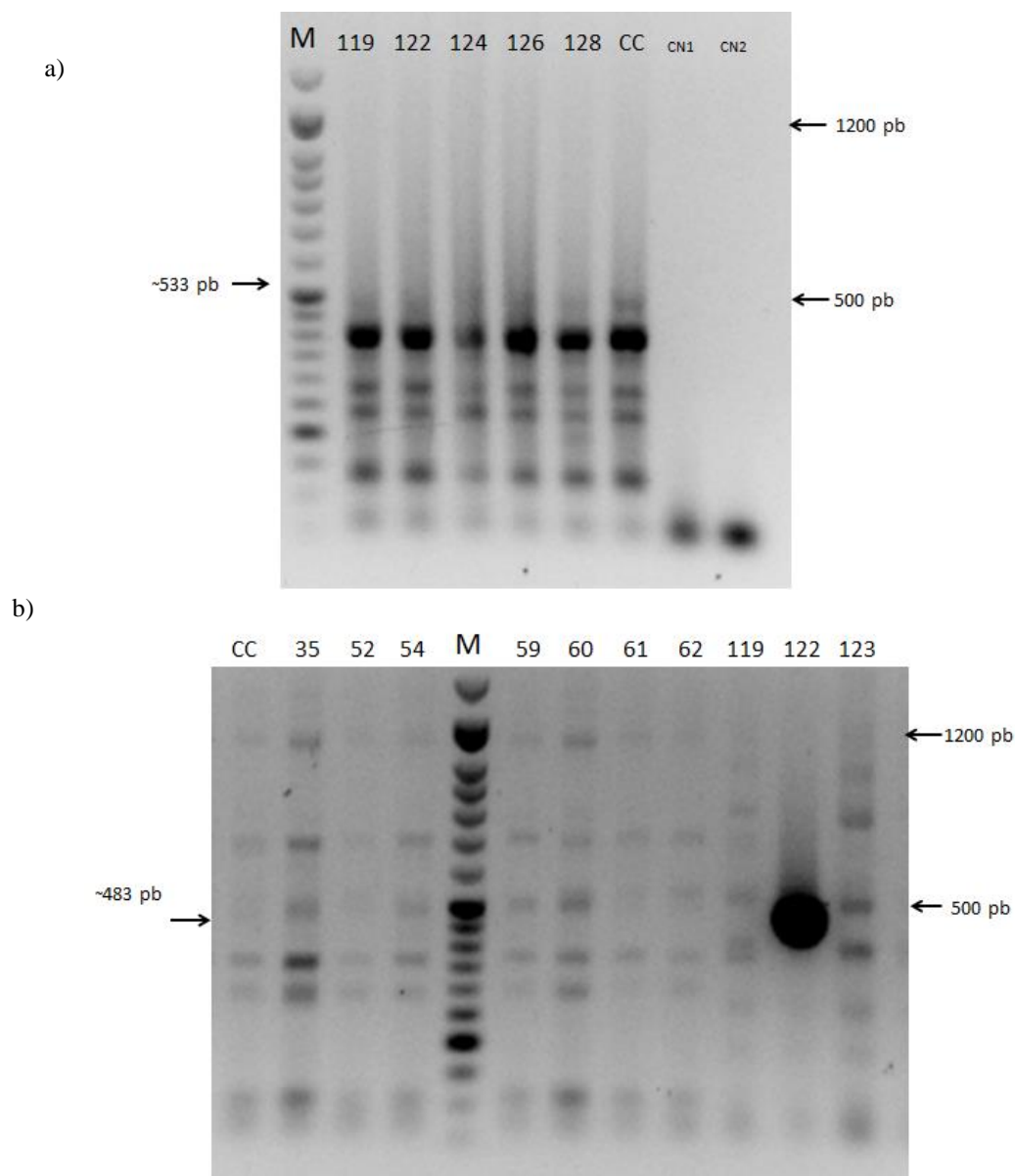


Figura 11 - Replicação de bocavírus (a) e bufavírus (b) em culturas celulares. Detecção de bocavírus (11a) e bufavírus (11b) por *nested* PCR para amplificação do gene viral NS1 a partir de DNA extraído de culturas celulares inoculadas com a suspensão de fezes. São apresentados os produtos da 2ª reacção de PCR após separação em gel de 1,5% de agarose. Estão indicadas as dimensões dos produtos esperados na 2ª reacção de PCR para bocavírus (~533 pb) e bufavírus (~483 pb). M- Marcador de tamanho molecular *NZYDNA Ladder VI* (NZYTech, Portugal); pb- pares de bases; CN1- Controlo negativo da primeira reacção; CN2- Controlo negativo da segunda reacção; CC- Controlo negativo das culturas celulares.

A figura 12 mostra um gráfico com as taxas de detecção presuntivas globais dos três vírus em estudo e as taxas de acordo com o tipo de hospedeiro de onde proveio a amostra fecal.

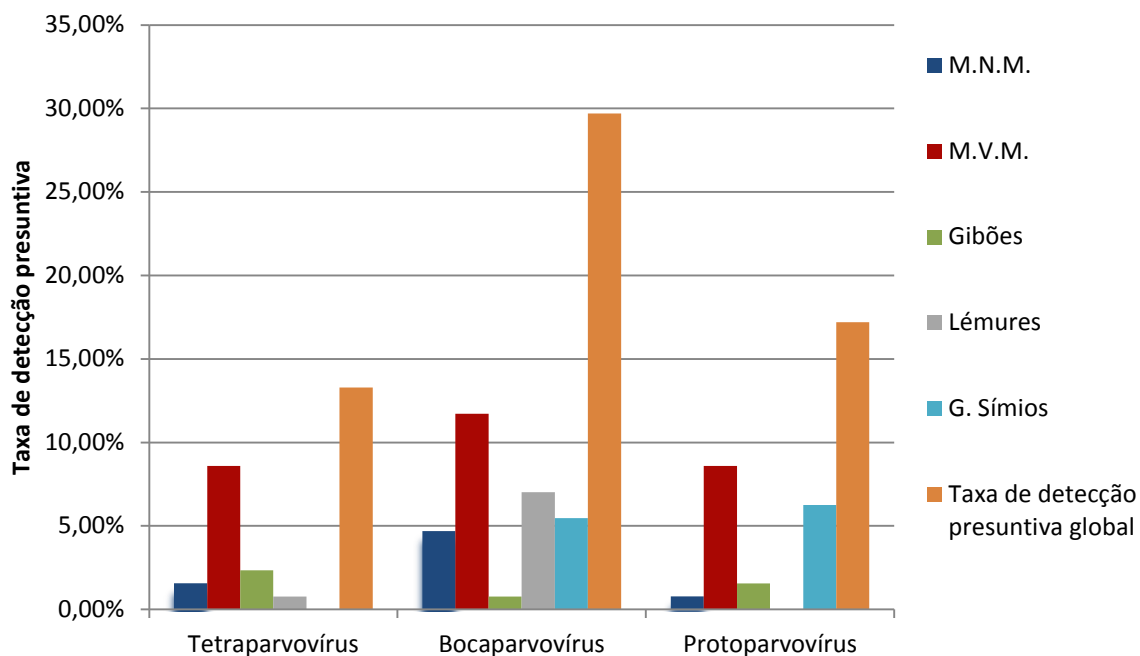


Figura 12 - Taxas de detecção presuntivas baseadas na amplificação por PCR da região codificadora do gene NS1 de PARV4, BoV e BuV. A cor-de-laranja está representada a taxa de detecção presuntiva global, para os três vírus, a azul-escuro a taxa de detecção presuntiva para macacos do Novo Mundo (M.N.M.), a vermelho para macacos do Velho Mundo (M.V.M.), a verde para gibões, a cinzento para lémures e a azul-claro para os grandes símios.

3.2. Clonagem molecular de DNA de parvovírus

3.2.1. PARV4

Face à enorme inespecificidade observada nas duas reacções de *nested* PCR de PARV4, a clonagem no vector *pGEM[®]-T Easy* (Promega, EUA), seguida de sequenciação, tornou-se obrigatória na identificação de potenciais amplicões de PARV4.

As amostras seleccionadas para clonagem molecular foram escolhidas de acordo com: a espécie de origem da amostra fecal, sendo seleccionadas diferentes espécies para se obter uma maior diversidade de hospedeiros; a especificidade da amplificação, ou seja elegeram-se amostras que apresentavam uma amplificação mais específica; tamanho do amplicão mais próximo do desejado; e o padrão de amplificação das reacções de PCR, sendo escolhidas amostras que apresentavam diferentes padrões de amplificação na primeira e na segunda reacção de PCR. Após uma análise mais cuidadosa dos padrões de migração, das 17 amostras inicialmente presumidas como positivas pela presença de um amplicão com o tamanho pretendido na 2ª reacção de PCR, 10 foram excluídas (amostras 21, 22, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 61, 64) por apresentarem na segunda reacção de amplificação um padrão igual ao da primeira reacção (Figura 5).

Das três amostras provenientes de macaco-do-japão (31, 36, 38), inicialmente foi seleccionada apenas a amostra 36 por apresentar uma amplificação mais específica. Os restantes fragmentos clonados eram oriundos de amostras fecais de mico-leão-de-jubadourada, siamango, saimiri-da-bolívia e lémure-de-cauda-anelada (amostras 10, 75, 86 e 97, respectivamente). Dos 5 fragmentos clonados apenas um resultou da amplificação da segunda reacção de PCR (amostra 10), os restantes foram fragmentos obtidos na primeira reacção de PCR e tinham o tamanho aproximado de 534 pb.

Para cada fragmento clonado no plasmídeo *pGEM[®]-T Easy* (Promega, EUA) foram seleccionadas 6 colónias bacterianas transformantes e foi extraído o DNA plasmídico de todas. Após a digestão enzimática do vector com a enzima EcoRI foram analisados os padrões de restrição dos plasmídeos recombinantes (Figura 13). É possível observar os fragmentos de aproximadamente 3015 pb correspondentes ao vector linearizado e, fragmentos de aproximadamente 296 pb (amostra 10) e 534 pb (amostras 75 e 97) correspondentes ao inserto de interesse. Os plasmídeos recombinantes foram então

seleccionados para posterior sequenciação com base no tamanho do inserto libertado, sendo por vezes necessário seleccionar dois clones por amostra quando os tamanhos eram muito próximos.

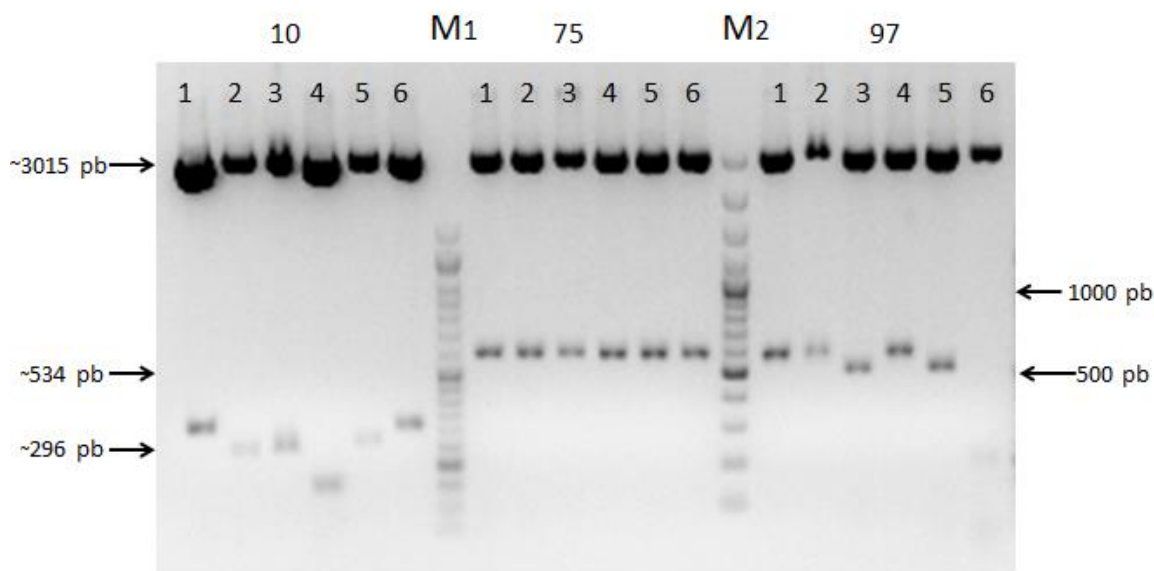


Figura 13 – Clonagem dos amplicões do gene NS1 de PARV4 das amostras 10, 75 e 97. Perfis de digestão com a enzima EcoRI dos plasmídeos *pGEM[®]-T Easy* recombinantes. Estão indicadas as dimensões esperadas dos insertos libertados (~534 pb, ~296 pb) e do vector linearizado (~3015 pb). M - Marcadores de tamanho molecular, 1- *NZYDNA Ladder VI* (NZYTech, Portugal), 2- *Gene Ruler[™] 100pb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, E.U.A); pb- pares de bases.

3.2.2. Bocavírus

No total, foram clonados no plasmídeo *pGEM[®]-T Easy* (Promega, EUA) produtos de PCR derivados de 16 amostras. Inicialmente foram clonados 13 amplicões (~533 pb) correspondentes às amostras 14, 15, 19, 26, 35, 36, 40, 54, 57, 62, 74 e 88. Foram clonados 2 amplicões correspondentes à amostra 74 por apresentarem ambos tamanhos muito próximos do esperado (~533 pb), o amplicão com o tamanho maior denominou-se 74+ e o amplicão com o tamanho menor 74-. Estes fragmentos resultaram de amplificações que se revelaram inespecíficas e/ou que resultaram em baixas quantidades de DNA. Outros critérios para a selecção das amostras para clonagem

molecular foram: a espécie de origem da amostra fecal, com selecção de amostras oriundas de diferentes espécies para se analisar uma maior diversidade de hospedeiros e a especificidade da amplificação, ou seja, elegeram-se as amostras que apresentavam uma amplificação mais específica.

Por outro lado, após a análise dos resultados da sequenciação directa de alguns produtos de PCR, duas amostras (99 e 110) apresentaram cromatogramas com muitas zonas ilegíveis, tornando-se inevitável a tentativa de obter uma nova sequência nucleotídica através da clonagem molecular. Foram também clonados dois fragmentos de 1330 pb, oriundos das amostras 124 e 126, resultantes da 1ª reacção de amplificação do gene VP de bocavírus (Figura 14).

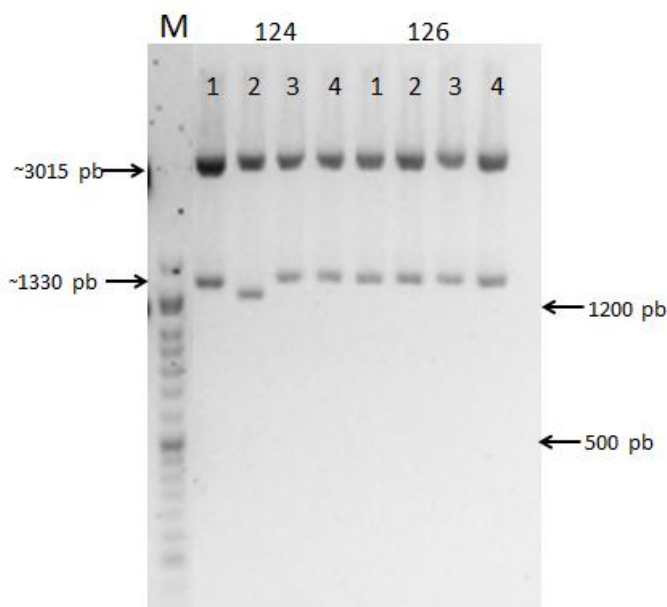


Figura 14 – Clonagem dos amplicões do gene VP1 de BoV provenientes das amostras 124 e 126. Perfis de migração dos produtos de digestão com a enzima EcoRI dos plasmídeos *pGEM®-T Easy* recombinantes. Estão indicadas as dimensões esperadas do inserto (~1330 pb) e do vector linearizado (~3015 pb). M - Marcador de tamanho molecular *NZYDNA Ladder VI* (NZYTech, Portugal); pb- pares de bases.

No total foram sujeitos a clonagem molecular 17 fragmentos de DNA (15 relativos a NS1 e 2 a VP1). Para cada clonagem extraiu-se DNA plasmídico de pelo menos 4

colónias bacterianas transformantes. Após a digestão enzimática pela enzima EcoRI, para cada fragmento clonado, com base no tamanho do inserto libertado e considerando a diversidade de tamanhos próximos com origem numa mesma amostra, foram seleccionados 1 a 3 plasmídeos para posterior sequenciação.

3.2.3. Bufavírus

Procedeu-se à clonagem molecular de 11 amplicões, proveniente de 10 amostras distintas, correspondentes ao gene NS1 (5, 8, 10, 56, 127) e VP1 (35, 54, 55, 58, 122).

A amplificação por PCR da sequência NS1 das amostras 5, 8 e 10 tinha resultado num padrão de migração inespecífico, ainda que com a presença do fragmento com o tamanho esperado (~483 pb). Este fragmento foi purificado a partir do gel de agarose e sequenciado directamente. A análise dos cromatogramas resultantes revelou a necessidade de se proceder à clonagem do mesmo. Foi extraído DNA plasmídico de 6 colónias bacterianas transformantes por cada amostra e, após a digestão enzimática pela enzima EcoRI, seleccionou-se um clone de cada transformação para posterior sequenciação com base no tamanho do inserto libertado.

A amplificação por PCR da região NS1 da amostra 127 resultou num fragmento com o tamanho desejado e muito abundante, este fragmento foi purificado e sequenciado directamente. No entanto, a análise dos cromatogramas resultantes revelou algumas regiões com sobreposição de picos, procedeu-se então à clonagem molecular deste fragmento. Foi extraído DNA plasmídico de 6 colónias bacterianas transformantes e, após a digestão enzimática, seleccionou-se um clone para posterior sequenciação.

A amplificação por PCR da região NS1 da amostra 56 resultou num fragmento com o tamanho desejado mas pouco abundante, sendo por isso também necessário proceder à clonagem molecular. Foi extraído DNA plasmídico das 3 colónias transformantes obtidas e após a digestão enzimática apenas dois dos insertos libertados tinham o tamanho desejado, sendo então seleccionados para posterior sequenciação.

Os restantes 6 fragmentos clonados provenientes das amostras 35, 54, 55, 58 e 122, resultaram da amplificação por PCR do gene VP1 e apresentavam um tamanho de aproximadamente 979 pb. Foram clonados dois fragmentos resultantes da amplificação

de DNA da amostra 35 pois a análise do seu padrão de migração mostrava a presença de duas bandas distintas muito próximas do tamanho esperado, o amplicão com o tamanho maior denominou-se 35+ e o amplicão com o tamanho menor 35-. Por cada um dos fragmentos de DNA clonados, foi extraído DNA plasmídico de 4 colónias bacterianas transformantes. Como é possível ver na figura 15, a digestão enzimática com EcoRI resultou numa heterogeneidade de tamanhos do inserto dentro de cada amostra e entre diferentes amostras. Assim, foram seleccionados para posterior sequenciação 2 plasmídeos transformantes por cada uma das transformações.

No total foram sujeitos a clonagem molecular 11 fragmentos de DNA, provenientes de 10 amostras, sendo seleccionados 18 clones para sequenciação pelo método de Sanger.

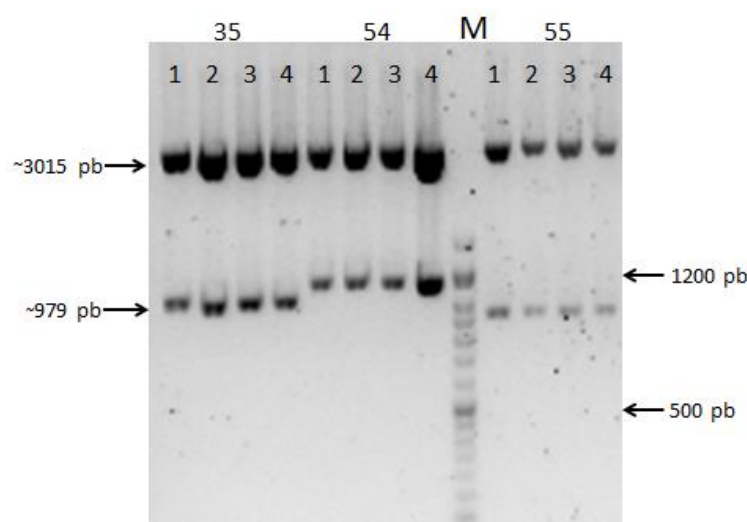


Figura 15 – Clonagem dos amplicões do gene VP1 de BuV relativo às amostras 35, 54 e 55. Perfis de migração dos produtos de digestão com a enzima EcoRI dos plasmídeos *pGEM[®]-T Easy* recombinantes. Estão indicadas as dimensões esperadas do inserto libertado (~979 pb) e do vector linearizado (~3015 pb). M - Marcador de tamanho molecular *NZYDNA Ladder VI* (NZYTech, Portugal); pb- pares de bases.

3.3. Identificação de parvovírus por sequenciação

Os fragmentos de DNA de parvovírus gerados por *nested* PCR foram directamente sequenciados com um *primer* interno de PCR ou quando clonados num vector plasmídico foram sequenciados com o *primer* universal T7. As sequências obtidas por sequenciação foram analisadas e editadas no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 7.2.5) e comparadas com todas as sequências disponíveis no website NCBI com recurso à ferramenta BLASTn para identificação de homologia genética.

3.3.1. PARV4

Foram sequenciados 7 amplicões clonados correspondendo presuntivamente a uma sequência do gene NS1 de PARV4, dois clones da amostra 10, dois clones da amostra 97 e um clone de cada uma das restantes amostras, 36, 75 e 86.

Os resultados de BLASTn indicaram não haver qualquer similaridade entre as sequências obtidas através da clonagem molecular e sequências de PARV4 ou de outros parvovírus disponíveis na base de dados do NCBI (Anexo 3). A taxa de detecção deste vírus nas amostras fecais de primatas não humanos poderá assim ser considerada nula. A maioria das sequências clonadas tem origem bacteriana, possivelmente representando a flora comensal dos próprios primatas (*e.g. Prevotella ruminicola*) ou resultantes da ingestão de alimentos (*e.g. Phoenix dactylifera*) (Anexo 3).

3.3.2. Bocavírus

No total foram sequenciados 40 fragmentos de DNA presumivelmente de bocavírus, 16 destes eram fragmentos directamente resultantes da amplificação por *nested* PCR do gene NS1, os restantes correspondiam a amplicões clonados.

Após edição das referidas 16 sequências nucleotídicas obtiveram-se 14 sequências passíveis de serem sujeitas a posterior análise, as duas restantes (99 e 110) continham demasiadas zonas ilegíveis difíceis de serem resolvidas e que depois de removidas diminuía consideravelmente o tamanho da sequência. Assim, estas amostras também foram sujeitas a clonagem molecular.

Dos 24 plasmídeos recombinantes sequenciados (oriundos de 14 amostras distintas), 19 continham como inserto um fragmento assumido como uma porção do gene NS1, os restantes 5 continham um fragmento presumivelmente do gene VP1.

No total foram obtidas 38 sequências nucleotídicas fiáveis, oriundas de 28 amostras distintas. Como resultado da sequenciação directa do fragmento assumido com uma fracção do gene NS1 foram obtidas 14 sequências de 14 amostras (101, 102, 103, 104, 105, 107, 111, 119, 121, 122, 124, 126, 127 e 128); como resultado da clonagem molecular do fragmento assumido com uma fracção do gene NS1 foram obtidas 19 sequências de 14 de amostras (14, 15, 19, 26, 35, 36, 40, 54, 57, 62, 74, 88, 99 e 110); e como resultado da clonagem molecular do fragmento assumido com uma fracção do gene VP1 foram obtidas 5 sequências de 2 amostras (124 e 126).

Todas as sequências nucleotídicas foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados NCBI, recorrendo à ferramenta BLASTn, para procurar similaridades com estas. Os resultados indicaram que apenas 7 sequências, provenientes de outras tantas amostras diferentes (119, 121, 122, 124, 126, 127 e 128), exibiam semelhanças com sequências nucleotídicas de bocavírus. Todas estas sequências resultaram da sequenciação directa de fragmentos amplificados de suspensões fecais de chimpanzé-comum (*Pan troglodites*) (Anexo 4). As restantes sequências nucleotídicas têm origem bacteriana, possivelmente representando a flora comensal dos próprios primatas (e.g. *Intestinimonas butyriciproducens*) ou oriundas do meio ambiente (e.g. *Streptomyces venezuelae*) (Anexo 4).

A taxa de detecção de bocavírus em primatas não humanos em cativeiro no Jardim Zoológico de Lisboa foi assim reduzida para 5,5% (7/128) (Anexo 4).

3.3.3. Bufavírus

Para identificação de bufavírus em fezes de primatas não humanos em cativeiro, foram sequenciados no total 39 fragmentos de DNA provenientes de 22 amostras distintas. Inicialmente foram sequenciados directamente 20 amplicões presuntivamente assumidos como sendo do gene NS1 de bufavírus de amostras fecais. De entre as sequências nucleotídicas editadas, 17 apresentaram similaridades com o genoma de bufavírus, sendo estas provenientes de amostras de macaco-do-japão (35), macaco-

cauda-de-leão (52, 54, 55, 57 e 58), macaco-de-nariz-branco (59, 60), gibão-de-mãos-brancas (61, 62) e chimpanzé-comum (119, 121, 123, 125, 126, 127 e 128). As restantes sequenciações (amostras 5, 8 e 10) originaram cromatogramas com muitas zonas ilegíveis, tendo-se procedido à clonagem molecular dos respectivos fragmentos, juntamente com o da amostra 56 que tinha revelado um padrão de amplificação inespecífico, na tentativa de obter uma sequência nucleotídica fiável.

Apesar dos resultados da sequenciação mostrarem que havia semelhança entre a sequência obtida da amostra de chimpanzé-comum 127 e sequências descritas de parvovírus, quando comparado o seu cromatograma com os das restantes sequências obtidas de amostras de animais da mesma espécie, este mostrou algum ruído de fundo, tendo-se procedido à clonagem molecular na tentativa de obter uma sequência mais fiável.

Sequenciaram-se então 6 plasmídeos recombinantes, presumidamente tendo inserido um segmento do gene NS1 de bufavírus, procedentes de 5 amostras diferentes (5, 8, 10, 56, 127). As sequências nucleotídicas relativas às amostras 5, 8 e 10 não mostraram similaridade com qualquer sequência depositada de bufavírus ou de outro parvovírus. Pelo contrário, as duas sequências oriundas da amostra 56 apresentaram similaridade com sequências de bufavírus já descritas. O cromatograma resultante da sequenciação do plasmídeo recombinante, presumidamente tendo inserido um segmento do gene NS1, procedente da amostra 127, mostrou-se menos questionável sendo portanto utilizada a sequência nucleotídica resultante para a restante análise.

Em simultâneo, foi sequenciado directamente um outro fragmento supostamente do gene NS1 de bufavírus mas obtido pela amplificação de DNA matriz extraído de culturas celulares inoculadas com a suspensão fecal da amostra 122 oriunda de chimpanzé-comum. A sequência apresentou similaridade com sequências descritas de bufavírus.

Por fim, foi sequenciado DNA do inserto de 12 plasmídeos recombinantes, supostamente correspondendo a um segmento do gene VP1 de bufavírus, proveniente das amostras 35 (4 clones), 54 (2 clones), 55 (2 clones), 58 (2 clones) e 122 (2 clones). Constatou-se que nenhuma das sequências nucleotídicas apresentava similaridade com

as sequências de parvovírus disponíveis. Mais uma vez, a maioria das sequências tinha origem bacteriana, possivelmente representando a flora comensal dos próprios primatas (e.g. *Faecalibacterium prausnitzii*) ou oriundas do meio ambiente (e.g. *Caulobacter sp.*) (Anexo 5).

Assim, das 22 amostras inicialmente consideradas como positivas para bufavírus, 19 revelaram a presença de DNA viral com homologia com o gene NS1 de BuV anteriormente descritos, sendo que numa delas o DNA viral foi amplificado a partir de uma cultura celular inoculada. Estes vírus foram assim identificados em amostras provenientes de chimpanzé-comum (*Pan troglodytes*, 8/10), gibão-de-mãos-brancas (*Hylobates lar*, 2/4) e em macacos do Velho Mundo, nomeadamente macaco-do-japão (*Macaca fuscata*, 1/10), macaco-cauda-de-leão (*Macaca silenus*, 5/5), macaco-de-nariz-branco (*Cercopithecus ascanius ascanius*, 2/4) e macaco-diana (*Cercopithecus diana*, 1/2) como descrito no anexo 5. Assim, a taxa de detecção de bufavírus em primatas não humanos em cativeiro no Jardim Zoológico de Lisboa é de 14,8% (19/128) (Anexo 5).

A figura 16 mostra um gráfico com as taxas de detecção globais dos três vírus em estudo e as taxas de acordo com o tipo de hospedeiro de onde proveio a amostra fecal.

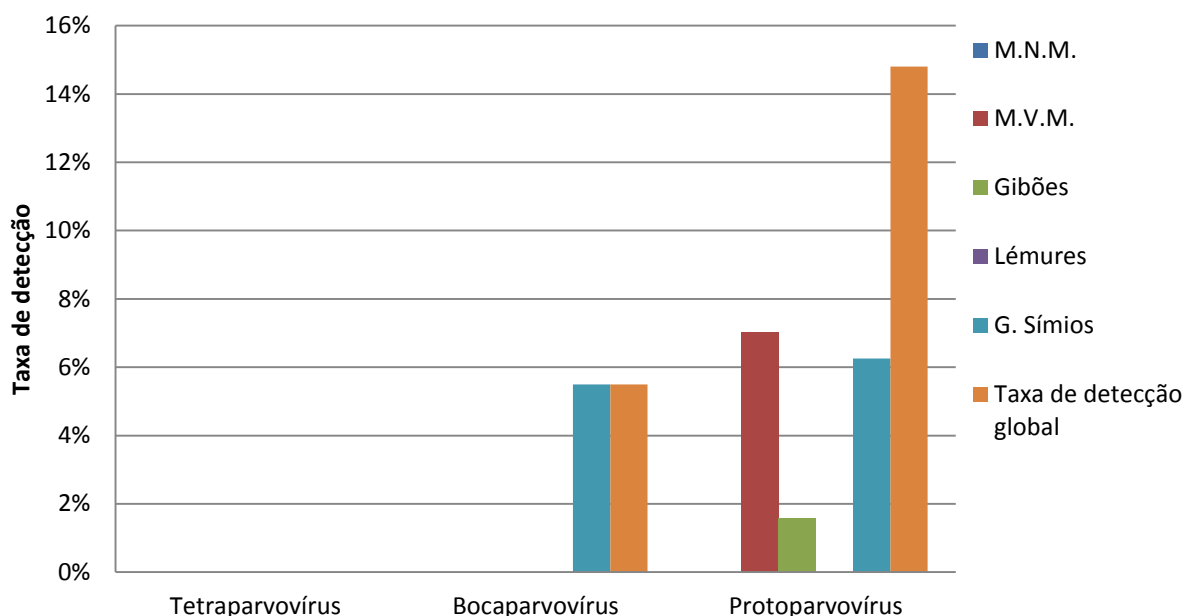


Figura 16 – Taxas de detecção de PARV4, BoV e BuV após sequenciação dos amplicões detectados por PCR. A cor-de-laranja está representada a taxa de detecção global

global, para os três vírus, a azul-escuro a taxa de detecção presuntiva para macacos do Novo Mundo (M.N.M.), a vermelho para macacos do Velho Mundo (M.V.M.), a verde para gibões, a cinzento para lémures e a azul-claro para os grandes símios.

3.4. Relações filogenéticas entre parvovírus baseadas em sequências NS1

A análise das relações filogenéticas entre as sequências NS1 de parvovírus obtidas no decurso deste estudo e sequências correspondentes de parvovírus depositadas nas bases de dados foi realizada como anteriormente descrito em 2.8.3.

3.4.1. Bocavírus

Procedeu-se à análise filogenética de 7 sequências nucleotídicas de bocavírus, provenientes de chimpanzé-comum (*Pan troglodites*) do Jardim Zoológico de Lisboa e de mais 33 sequências correspondentes do genoma de bocavírus, maioritariamente de primatas (31), retiradas das bases de dados e usadas como sequências de referência (Anexo 7). Estas sequências consistem em 439 posições nucleotídicas do gene NS1. Para a construção da árvore filogenética apresentada na figura 17 usaram-se no total 40 sequências, sendo seleccionada como *outgroup* uma sequência de parvovírus bovino.

A árvore filogenética construída apresenta uma boa qualidade, com valores de *bootstrap* genericamente elevados. É possível distinguir claramente, suportadas por valores de *bootstrap* de 100%, as duas espécies de bocavírus de primatas. A primeira - *Primate bocaparvovirus 1* - engloba vírus humanos (HBoV1 e HBoV3) e vírus de primatas não humanos (chimpanzés e gorilas). A segunda espécie - *Primate bocaparvovirus 2* - inclui apenas vírus humanos (HBoV2 e HBoV4). As sequências de HBoV1, HBoV3, HBoV4 e dos bocavírus de gorilas constituem agrupamentos com ramos curtos e suportados por valores de *bootstrap* de 100%. Por outro lado, HBoV2 apresenta uma maior diversidade com pelo menos três linhagens genéticas.

Em relação às 7 sequências de bocavírus de chimpanzé-comum deste estudo (ZLX119, ZLX121, ZLX122, ZLX124, ZLX126, ZLX127, ZLX128), e como era expectável por tratar-se de animais em coabitação, verifica-se uma grande homogeneidade entre as sequências. Em conjunto, estas sequências formam um grupo monofilético bem evidente (*bootstrap* 100%), estando mais próximas da sequência de um bocavírus de chimpanzé HQ113146, com a qual surgem agrupadas com um valor de *bootstrap* de 99%. No que respeita a esta região do genoma, os bocavírus deste estudo são

claramente classificados na espécie *Primate bocaparvovirus 1*, a qual engloba todas as sequências de bocavírus descritas para primatas não humanos. Contrariamente à sequência do bocavírus de chimpanzé HQ113148 que surge segregada com as de HBoV1, as sequências de bocavírus de Lisboa surgem num agrupamento distinto com outras sequências de bocavírus de chimpanzé e de HBoV3.

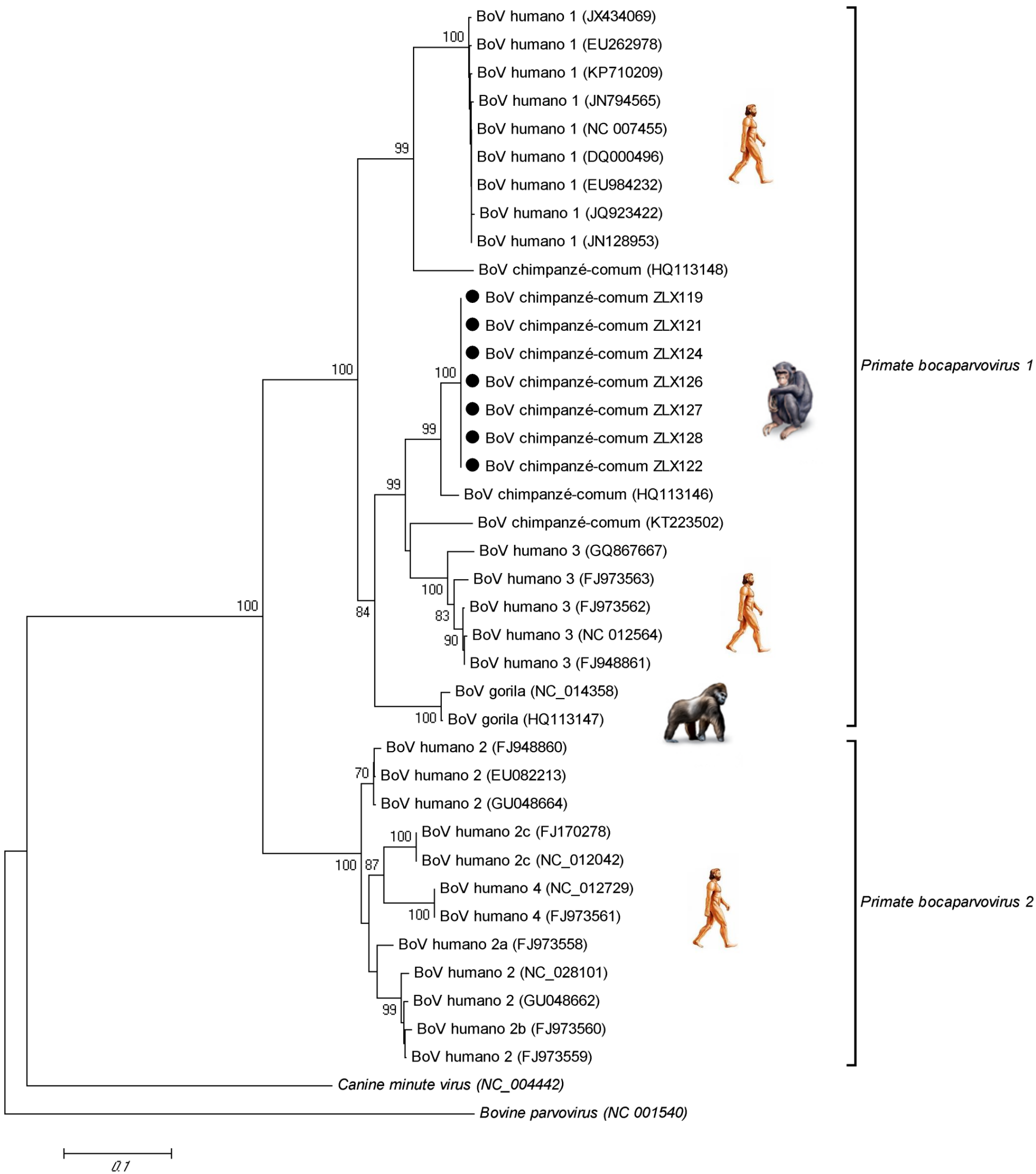


Figura 17 - Árvore filogenética de bocavírus (BoV). A história evolutiva foi inferida usando o método *Neighbor-Joining* (Saitou and Nei, 1987) com base em sequências do gene NS1. A percentagem de réplicas nas quais há associação $\geq 70\%$ das sequências agrupadas no teste de *bootstrap* (1000 réplicas) está apresentada na base das ramificações (Felsenstein, 1985). As distâncias evolutivas foram calculadas pelo método de 2 parâmetros de Kimura (Kimura, 1980). A análise incluiu 40 sequências nucleotídicas, todas as posições que continham *gaps* ou dados em falta foram eliminadas, sendo no total analisadas 439 posições nucleotídicas. Esta análise foi realizada no programa MEGA, versão 5 (Tamura *et al.*, 2011). Entre parêntesis está indicado o número de acesso das sequências de referência.

3.4.2. Protoparvovírus

Na análise das relações filogenéticas dos bufavírus identificados, entre si e com outros bufavírus descritos, foram usadas 23 sequências relativas ao gene NS1 (357 posições nucleotídicas) obtidas durante o estudo. Dezanove correspondiam a primatas não humanos (8 de chimpanzé-comum, 5 de macaco-cauda-de-leão, 2 de gibão-de-mãos-brancas, 2 de macaco-de-nariz-branco, 1 de macaco-do-japão e 1 de macaco-diana), duas eram de morcego e outras duas de pequenos mamíferos do Jardim Zoológico. Foram incluídas mais 33 sequências nucleotídicas correspondentes (32 de protoparvovírus e 1 de amdoparvovírus usada como *outgroup*) retiradas das bases de dados como sequências de referência (Anexo 8). No total, foram utilizadas 56 sequências nucleotídicas para a construção da árvore filogenética apresentada na figura 18.

A topologia da árvore filogenética construída com base nestas sequências apresenta, genericamente, boa qualidade. As sequências de bufavírus formam na sua totalidade um agrupamento bem distinto, suportado por um valor de *bootstrap* de 78%, separadas dos outros protoparvovírus. Não se observa uma separação clara entre sequências de bufavírus de primatas e de outros mamíferos não primatas. No entanto, de um modo geral, as sequências de bufavírus surgem segregadas de acordo com o grupo taxonómico do hospedeiro de onde derivam. São excepções mais óbvias a sequência ZLX56, proveniente de macaco-diana, que não faz parte de qualquer um dos agrupamentos de bufavírus de primatas, e as sequências de pequenos mamíferos capturados no Zoo de Lisboa (ZLX162 e ZLX163) que surgem entre as de bufavírus de primatas.

Relativamente às sequências de bufavírus obtidas a partir de macacos do Velho Mundo do Zoo de Lisboa (sequências ZLX35, ZLX52, ZLX54, ZLX55, ZLX57, ZLX58, ZLX59 e ZLX60) observa-se a sua inclusão num grupo monofilético (valor de *bootstrap* 98%) que inclui todas as sequências correspondentes de referência depositadas nas bases de dados também com origem em espécies de macacos do Velho Mundo. Assim, as sequências BuV macaco-de-nariz-branco ZLX59 e ZLX60 surgem agrupadas com sequências de referência de bufavírus de babuínos (LC011423, LC011424) (valor de *bootstrap* 99%), enquanto as sequências provenientes de espécies pertencentes ao género *Macaca*, *i.e.* BuV macaco-do-japão ZLX35 e BuV macaco-

cauda-de-leão ZLX54, ZLX57, ZLX58, ZLX52 e ZLX55 e a sequência WUHARV macaco-rhesus (JX627576), formam um agrupamento separado com um valor de *bootstrap* de 98%. Observa-se ainda alguma heterogeneidade genética entre as sequências de bufavírus de macaco-cauda-de-leão que se encontram dispersas por dois subgrupos distintos (Figura 18). A outra sequência deste estudo com origem num macaco do Velho Mundo (BuV macaco-diana ZLX56), não faz parte deste agrupamento, mas antes situa-se aparentemente mais perto de sequências de bufavírus de suínos, embora sem suporte significativo.

As sequências provenientes de chimpanzé-comum (BuV chimpanzé-comum ZLX119, ZLX121, ZLX122, ZLX123, ZLX125, ZLX126, ZLX127 e ZLX128) formam com as de bufavírus humanos um grupo monofilético distinto (valor de *bootstrap* de 100%). No entanto, enquanto a maioria surge mais próxima de bufavírus humano 2, a sequência ZLX123 surge misturada com as de bufavírus humanos 1 e 3.

As duas sequências obtidas de amostras de gibão-de-mãos-brancas (BuV gibão-de-mãos-brancas ZLX61 e ZLX62), deram origem a um grupo monofilético (valor de *bootstrap* 100%) bem isolado de todas outras sequências incluídas na análise filogenética, apontando para uma sequência muito divergente dentro do *cluster* dos bufavírus.

Em relação às sequências obtidas a partir de amostras fecais de morcegos (BuV morcego PTM65 e PTM71), como era espectável, surgem segregadas com as sequências de outros bufavírus de morcegos da subordem *Microchiroptera*, sendo o grupo monofilético em que estão incluídas suportado por um valor de *bootstrap* 100%.

No que respeita às sequências obtidas de pequenos mamíferos (sequências ZLX162 e ZLX163), os resultados da análise filogenética não foram os esperados uma vez que surgem agrupadas com algumas das sequências obtidas neste estudo provenientes de chimpanzé-comum (valor de *bootstrap* 95%) e estão incluídas no grupo monofilético onde se agrupam também os bufavírus humanos, suportado por um valor de *bootstrap* de 100%.

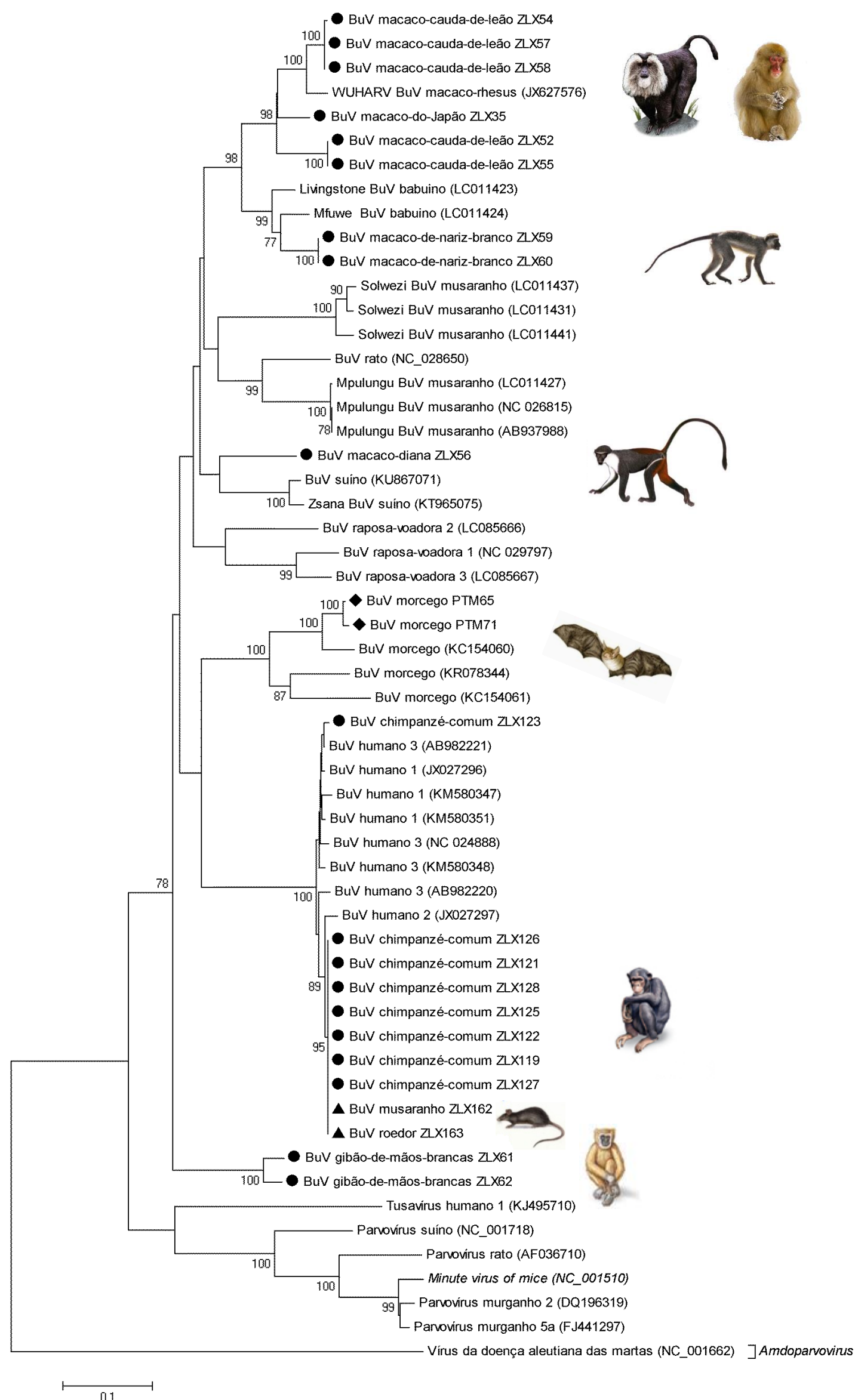


Figura 18 - Árvore filogenética de protoparvovírus. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) com base em sequências do gene NS1. A percentagem de réplicas nas quais há associação $\geq 70\%$ das sequências agrupadas no teste de *bootstrap* (1000 réplicas) é apresentada na base das ramificações (Felsenstein, 1985). As distâncias evolutivas foram calculadas pelo método Kimura 2 parâmetros (Kimura, 1980). A análise incluiu 56 sequências nucleotídicas, todas as posições que continham *gaps* ou dados em falta foram eliminadas, sendo no total analisadas 357 posições nucleotídicas. Esta análise foi realizada no programa MEGA, versão 5 (Tamura *et al.*, 2011). Os números de acesso das sequências de referência estão entre parêntesis.

4. Discussão e Conclusões

Os membros da família *Parvoviridae* infectam uma vasta variedade de hospedeiros, frequentemente pela via fecal-oral, causando infecções assintomáticas ou um largo espectro de doenças agudas e crônicas em animais (Phan *et al.*, 2012; Berns and Parrish, 2013; Kemenesi *et al.*, 2015). O parvovírus humano B19, pertencente ao género *Erythroparvovirus*, foi considerado durante vários anos, como o único parvovírus autónomo capaz de infectar humanos. Só mais recentemente foram descobertos os parvovírus humanos 4 (PARV4), os bocavírus humanos (HBoV) e os bufavírus humanos (HBuV). A infecção por PARV4 parece ser essencialmente assintomática e, apesar de haver alguns estudos que descrevem patologias associadas, não há uma relação forte entre a presença destes vírus e os sintomas descritos (Matthews *et al.*, 2014). Os bocavírus já há algum tempo eram conhecidos pelo modo como afectam alguns animais, particularmente bovinos e canídeos, mas a sua patogenicidade em primatas ainda não está bem caracterizada (Sharp *et al.*, 2010; Ong, Schuurman and Heikens, 2016). O mesmo acontece com os bufavírus, cujo envolvimento directo no desenvolvimento de patologias gastrointestinais em humanos ainda não é claro (Chieochansin *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2015; Altay *et al.*, 2015).

Desde a descoberta destes três últimos parvovírus humanos, foram publicados menos de uma dezena de estudos descrevendo a detecção de sequências genómicas em primatas não humanos. Particularmente, genomas de PARV4 foram identificados em sangue e vários tecidos de chimpanzé (*Pan troglodytes*) e macacos do Velho Mundo (*Papio anubis*, *Piliocolobus badius* e *Colobus polykomos*) em liberdade (Sharp *et al.*, 2010; Adlhoch *et al.*, 2012). Relativamente aos bocavírus, amostras fecais de grandes símios (*Pan troglodytes* e *Gorilla gorilla*) em cativeiro em Zoos (Kapoor *et al.*, 2010a; Brožová *et al.*, 2016) e santuários de vida selvagem (Sharp *et al.*, 2010) revelaram a presença de sequências genómicas destes vírus. Na Zâmbia, um rastreio de musaranhos e macacos do Velho Mundo permitiu detectar vírus estreitamente relacionados com bufavírus em duas espécies de babuínos (*Papio cynocephalus* e *P. ursinus*) (Sazaki *et al.*, 2015). Sequências genómicas destes vírus já anteriormente tinham sido descritas quando da análise do viroma de macacos-rhesus infectados experimentalmente com vírus da imunodeficiência símia (Handley *et al.*, 2012).

O estudo da prevalência, diversidade genética, gama de hospedeiros e distribuição geográfica de agentes patogénicos virais de origem animal que possam causar doença no Homem é bastante importante, particularmente em primatas não humanos devido à sua proximidade evolutiva e possibilidade de transmissão de vírus entre espécies. Por outro lado, a análise destes vírus em primatas não humanos pode também fornecer informações acerca da origem e história evolutiva dos vírus que infectam humanos e dos respectivos hospedeiros.

Neste estudo pretendeu-se detectar, identificar e fazer uma caracterização genética preliminar dos parvovírus PARV4, BoV e BuV presentes em amostras fecais de primatas não humanos em cativeiro no Jardim Zoológico de Lisboa. A detecção consistiu essencialmente na amplificação de uma sequência conservada do gene NS1 por *nested* PCR com *primers* universais, seguida de sequenciação dos amplicões e análise filogenética das sequências obtidas.

Ainda que muito mais limitada, a utilização de *primers* universais degenerados em reacções de PCR é uma alternativa acessível para a detecção de vírus nos laboratórios impossibilitados de fazer análises de metagenómica. Porém, o uso destes *primers*, geralmente acompanhado de temperaturas de emparelhamento baixas, em amostras complexas, como é o caso das fecais, dá frequentemente origem a perfis de amplificação inespecífica que dificultam a análise. De facto, este tipo de padrão de múltiplas bandas foi observado particularmente no caso da detecção de vírus do tipo PARV4 e bocavírus (Figuras 5 e 6) em que os *primers* são mais degenerados, contrariamente à amplificação específica observada para os bufavírus (Figuras 8 e 9) com *primers* que apresentam um menor grau de degenerescência (Tabela 1). No primeiro caso pode-se incorrer numa sobreavaliação da taxa de detecção com eventuais falsos positivos ou ainda na incapacidade de detectar genomas virais presentes em pequenas quantidades e que passarão despercebidos na inespecificidade de fundo (falsos negativos).

A presença de amplicões com o tamanho esperado, potencialmente correspondente ao gene de interesse NS1 de PARV4, ocorreu em 17 das 128 amostras, correspondendo a uma taxa de detecção presuntiva de 13,3% (Figura 12; anexo 2). Perante o perfil de amplificação inespecífica, a sequenciação foi precedida de clonagem do fragmento de

interesse em plasmídeo. Com base na dimensão e intensidade do amplicão e também na diversidade de espécies de origem, seleccionaram-se 5 amostras distintas para a clonagem molecular provenientes de macaco-do-japão (*Macaca fuscata*), mico-leão-de-juba-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*), siamango (*Symphalangus syndactylus*), saimiri-da-bolívia (*Saimiri boliviensis*) e lémure-de-cauda-anelada (*Lemur catta*). No entanto, as sequências nucleotídicas obtidas a partir dos plasmídeos recombinantes, quando comparadas com todas as sequências existentes nas bases de dados, não revelaram similaridade com sequências de PARV4 ou de qualquer outro parvovírus (Anexo 3). Todos os fragmentos sequenciados eram derivados de outras entidades, sendo que a maioria eram bactérias encontradas no tracto intestinal de diversos animais (Anexo 3). Perante estes resultados, e uma vez que o padrão dos produtos de PCR das restantes amostras consideradas positivas era idêntico ao das seleccionadas para sequenciação, optou-se por não dar continuação à sua sequenciação e considerar a eventualidade da presença de PARV4 nas amostras fecais ser quase nula ou mesmo nula. No entanto, esta última hipótese carece de confirmação através da sequenciação de um maior número de plasmídeos recombinantes para cada amostra.

Por outro lado, se considerarmos o tipo de amostras estudado, este resultado poderá ser considerado expectável. No Homem, os vírus PARV4 têm sido identificados essencialmente em amostras de sangue e associados a transmissão parentérica em populações de toxicodependentes utilizadores de drogas por via intravenosa e doentes com hemofilia (Matthews *et al.*, 2014). No entanto, um estudo realizado no Gana revelou a presença deste vírus em amostras nasais e fecais de crianças, mas com prevalências muito baixas, 0,83% e 0,53% respectivamente (Drexler *et al.*, 2012). Vírus do tipo PARV4 foram ainda detectados em concentrações elevadas no sangue de raposas voadoras (Canuti *et al.*, 2011) e em vários tecidos de primatas não humanos, designadamente sangue, medula óssea, baço, músculo, fígado e pulmão (Sharp, *et al.*, 2010; Adlhoch *et al.*, 2012) mas não em amostras fecais. Em bovinos e suínos de Hong Kong foram igualmente identificados vírus do tipo PARV4, designados hokovírus, presentes maioritariamente em nódulos linfáticos (66-80%) e soro (42-50%) e em apenas 10% das amostras fecais (Lau *et al.*, 2008). Um outro factor que poderá ser responsável pela dificuldade em detectar PARV4 em amostras fecais é o vírus ser excretado em quantidades reduzidas quando do estabelecimento de uma infecção

persistente revelada pela presença contínua de DNA viral em diversos tecidos (Manning *et al.*, 2007; Schneider, 2008).

Os bocavírus inicialmente identificados em bovinos e canídeos, foram subsequentemente detectados em produtos biológicos humanos e em primatas não humanos (Allander *et al.*, 2005; Kapoor *et al.*, 2010a; Brožová *et al.*, 2016). Em 38 das amostras de símios testadas ocorreu amplificação por PCR de um fragmento com o tamanho esperado, correspondendo a uma taxa de detecção presuntiva de 29,7% (38/128) (Figura 12; anexo 2).

Porém, amplicões provenientes de 28 amostras distintas quando sequenciados deram origem apenas a 7 sequências nucleotídicas de bocavírus, correspondentes a outras tantas amostras, todas com origem em chimpazé-comum (*Pan troglodites*). A maioria das sequências nucleotídicas obtidas apresenta homologia com sequências de bactérias encontradas no tracto intestinal e no solo, à semelhança do encontrado para PARV4 (Anexos 3 e 4). Apesar de não terem sido sequenciados todos os amplicões (*i.e.* apenas os correspondentes a 28 amostras de um total de 38 com produto de PCR do tamanho pretendido), o resultado não é estranho face ao grau de degenerescência dos *primers* usados, condições de amplificação e tipo de amostra empregada como matriz de amplificação.

Assim, a taxa de detecção de bocavírus em primatas não humanos em cativeiro no Jardim Zoológico de Lisboa é substancialmente mais baixa que a sugerida inicialmente pela simples análise dos produtos de PCR (5,5%, 7/128), como é possível ver na figura 16. Por outro lado, o facto de terem sido identificados bocavírus apenas em amostras de chimpanzé-comum está em conformidade com dados da literatura relativos a estudos que envolvem primatas não humanos e que descrevem a identificação de DNA de bocavírus apenas em grandes símios. Um estudo realizado numa colónia de gorilas (*Gorilla gorilla*) em cativeiro na América do Norte, durante um surto de diarreia aguda, identificou bocavírus em 4 amostras fecais (Kapoor *et al.*, 2010a). Um outro estudo realizado num santuário de vida selvagem nos Camarões descreve frequências de sero-actividade contra proteínas de bocavírus de 27%, 8% e 0,03% para gorilas (n= 11), chimpanzés (n=62) e macacos do Velho Mundo (n=91), respectivamente. Os mesmos animais, quando testados por PCR relativamente à presença de sequências genómicas de

bocavírus, revelaram DNA viral em apenas dois gorilas e dois chimpanzés e ausência de sequências de DNA de bocavírus em macacos do Velho Mundo, em consonância com os valores de seroprevalência encontrados (Sharp *et al.*, 2010). Ainda, o rastreio de DNA de bocavírus em amostras de fezes de um grupo de símios saudáveis (25 chimpanzés, 10 gorilas e 118 macacos do Velho Mundo) de Zoos da República Checa e da Eslováquia demonstrou a presença de ácido nucleico de bocavírus apenas numa amostra de chimpanzé de um total de três com o amplicão do tamanho esperado (Brožová *et al.*, 2016).

Para elucidar as relações filogenéticas dos bocavírus detectados com outros bocavírus humanos e de símios anteriormente descritos, construíram-se árvores filogenéticas com base nas 7 sequências do fragmento amplificado do gene NS1 e em 33 sequências correspondentes retiradas das bases de dados (439 posições nucleotídicas). Na árvore construída (Figura 17), suportados por valores de *bootstrap* de 100%, é claramente possível distinguir os grupos de sequências correspondentes às duas espécies de bocavírus de primatas, a primeira – *Primate bocaparvovirus 1* - engloba HBoV1, HBoV3 e vírus de primatas não humanos e a segunda espécie – *Primate bocaparvovirus 2* - engloba apenas os vírus humanos HBoV2 e HBoV4. Curiosamente, as sequências de referência de bocavírus de gorila surgem num agrupamento isolado relativamente às sequências de vírus de chimpanzés e de HBoV1 e HBoV3, enquanto as sequências de bocavírus de chimpanzés estão mais dispersas na árvore, duas (HQ113146, KT223502) surgindo mais próximas de HBoV3 e uma (HQ113148) mais próxima de HBoV1. Esta topologia está em concordância com a das árvores filogenéticas baseadas no gene NS1 (sequência completa ou parcial) descritas na literatura (Babkin *et al.*, 2013; Brožová *et al.*, 2016).

As sequências nucleotídicas de bocavírus deste estudo (ZLX119, ZLX121, ZLX122, ZLX124, ZLX126, ZLX127, ZLX128), derivadas de chimpanzé-comum (*Pan troglodites*), apresentam claramente uma grande homogeneidade manifestada pela ausência de ramos com tamanho perceptível (Figura 17). Este facto poderá ser justificado por as amostras terem origem em animais da mesma espécie e que coabitam o mesmo recinto. O conjunto das sete sequências nucleotídicas forma um grupo monofilético distinto, suportado por um valor de *bootstrap* de 100%, e surge claramente

associado às sequências da espécie *Primate bocaparvovirus 1* (valor de *bootstrap* de 100%) que engloba, para além dos genótipos de bocavírus humanos HBoV1 e HBoV3, todas as sequências de bocavírus descritas em primatas não humanos. Esta relação evolutiva próxima entre bocavírus encontrados em grandes símios e humanos levou a postular a divergência dos bocavírus humanos de um ancestral comum aos bocavírus dos grandes símios (Babkin *et al.*, 2013). Todas as sequências de bocavírus deste estudo derivadas de chimpanzé-comum são filogeneticamente mais próximas de HBoV3 que de HBoV1 e estão estreitamente relacionadas com a de um bocavírus de chimpanzé (HQ113146) (valor de *bootstrap* de 99%). Este bocavírus de chimpanzé, descrito por Sharp e colaboradores (2010), foi descoberto num animal em cativeiro num santuário de vida selvagem nos Camarões, os animais terão nascido no seu habitat selvagem e só mais tarde foram transportados para o santuário. Curiosamente, a sequência de um fragmento do gene VP2 deste bocavírus surgiu com um posicionamento filogenético diferente, não se agrupando com as sequências de HBoV3 mas antes surgindo como *outgroup* relativamente a estas (Sharp *et al.*, 2010). Uma outra sequência de bocavírus de chimpanzé CPZh2 (KT223502) descrita por Brožová e colaboradores (2016) apresenta também inconsistência filogenética para diferentes regiões do genoma. Enquanto a análise filogenética baseada no gene NS1 revela uma relação evolutiva próxima com HBoV3, como é possível verificar na figura 17, a análise filogenética com base no gene VP1 coloca-o mais próximo de um grupo formado por GBoV e HBoV1 (Brožová *et al.*, 2016).

As inconsistências nas relações filogenéticas destes bocavírus símios, referidas acima, apoiam a ideia da história evolutiva destes vírus poder ser guiada por eventos de recombinação. Inclusivamente, esta inconsistência filogenética resultante de recombinação parece ser frequente e extensível a bocavírus de outras espécies de hospedeiros, nomeadamente humanos (Arthur *et al.*, 2009; Kapoor *et al.*, 2010b; Cheng *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2011; Cashman and O'Shea, 2012), canídeos (Fu *et al.*, 2011) e suínos (Yoo *et al.*, 2015). Infelizmente não nos foi possível amplificar e sequenciar um fragmento do gene VP1 do genoma dos bocavírus deste estudo. Esta análise seria uma primeira abordagem à eventualidade de estarmos perante vírus recombinantes, à semelhança do que foi descrito para o bocavírus de chimpanzé mais próximo dos nossos no fragmento NS1 analisado.

Para a identificação de bufavírus em fezes de primatas não humanos em cativeiro, foi tentada a amplificação por *nested* PCR de um fragmento do gene NS1 de bufavírus. A amplificação do fragmento com o tamanho esperado ocorreu em 22 das 128 amostras analisadas (Anexo 2). Contrariamente ao que ocorreu com PARV4 e bocavírus, quando da sequenciação dos amplicões a maioria destes verificou-se corresponder a DNA de bufavírus (19/22), tendo a taxa de detecção passado de 17,2% (Figura 12) para 14,8% (Figura 16). A este facto não é alheio o menor grau de degenerescência dos *primers* específicos de bufavírus e a concomitante especificidade dos produtos de PCR obtidos (Figura 8 e 9). Esta taxa de detecção é substancialmente mais elevada que a obtida num rastreio de macacos do Velho Mundo na Zâmbia, em que foram detectadas sequências de DNA de bufavírus em 3 babuíños de um total de 189 animais testados (Sasaki *et al.*, 2015). Esta discrepância de valores poderá estar relacionada com o facto dos animais deste último estudo viverem em liberdade e ainda as amostras usadas no rastreio serem de baço, que poderá não ser o órgão alvo destes vírus. Por outro lado, as frequências de detecção em amostras fecais humanas descritas na literatura não excedem 4% (Väisänen *et al.*, 2014a; Chieochansin *et al.*, 2015).

Identificou-se DNA genómico de bufavírus numa grande variedade de hospedeiros, nomeadamente em amostras provenientes de chimpanzé-comum (*Pan troglodytes*, n=8), gibão-de-mãos-brancas (*Hylobates lar*, n=2) e em macacos do Velho Mundo, nomeadamente macaco-do-japão (*Macaca fuscata*, n=1), macaco-cauda-de-leão (*Macaca silenus*, n=5), macaco-de-nariz-branco (*Cercopithecus ascanius ascanius*, n=2) e macaco-diana (*Cercopithecus diana*, n=1) (Anexo 5). É de salientar que se trata da primeira descrição da detecção de bufavírus para qualquer uma das espécies mencionadas. Curiosamente estes vírus foram anteriormente identificados em duas espécies de babuíños (Sasaki *et al.*, 2015) mas no nosso estudo tal não se verificou. Não foi possível detectar estes vírus em macacos do Novo Mundo ou no grupo dos lémures.

A análise das relações filogenéticas dos bufavírus identificados, entre si e com outros protoparvovírus com sequências correspondentes nas bases de dados, implicou a construção de árvores filogenéticas em que foram incluídas as 23 sequências nucleotídicas de uma porção do gene NS1 (357 nt) obtidas neste estudo (19 de primatas não humanos, 2 de morcegos e 2 de pequenos mamíferos) e 33 sequências nucleotídicas

correspondentes retiradas das bases de dados. A árvore da figura 18 apresenta vários grupos monofiléticos bem suportados por valores de *bootstrap* elevados (> 95%), normalmente envolvendo sequências provenientes de hospedeiros da mesma espécie ou do mesmo género. No entanto, também se observam vários agrupamentos maiores pouco consistentes (valor de *bootstrap* <70%) que incluem sequências virais do tipo bufavírus com origem em hospedeiros diversos e que dificultam a inferência da história evolutiva deste grupo de vírus. A robustez da árvore poderá ser aumentada, *e.g.*, com a utilização de sequências maiores (por exemplo genomas completos) e/ou com um maior número de sequências introduzidas uma vez que a descoberta dos bufavírus é muito recente.

Os macacos do Velho Mundo formam a família *Cercopithecidae* que se divide em duas subfamílias, *Colobinae* e *Cercopithecinae*. Todos os bufavírus identificados em animais da família *Cercopithecidae* pertencem à subfamília *Cercopithecinae*. A impossibilidade de detectar bufavírus na subfamília *Colobinae* poderá ser justificada pelo número reduzido de animais testados desta subfamília (n=10). A subfamília *Cercopithecinae* divide-se em duas tribos, *Cercopithecus* e *Papionini*. A tribo *Cercopithecus* inclui, entre outros, o género *Cercopithecus* e na tribo *Papionini* incluem-se os géneros *Papio* e *Macaca*. Exceptuando a sequência de bufavírus proveniente do macaco-diana, todas as outras sequências virais oriundas de macacos do Velho Mundo formam um agrupamento suportado por um valor de *bootstrap* de 98%, tornando possível identificar na árvore filogenética um ancestral comum a estes vírus de macacos do Velho Mundo. Ainda, dentro deste agrupamento é possível distinguir um grupo monofilético, suportado por um valor de *bootstrap* de 98%, que inclui todas as sequências oriundas de indivíduos do género *Macaca* [*M. silenus* (macaco-cauda-de-leão); *M. mulatta* (macaco-rhesus); *M. fuscata* (macaco-do-japão)].

As sequências obtidas da espécie *Macaca silenus* (macaco-cauda-de-leão) apresentam alguma diversidade genética formando dois grupos distintos, ambos suportados por valores de *bootstrap* de 100%. Curiosamente, as sequências das amostras ZLX54, ZLX57 e ZLX58, agrupam-se com a sequência descrita do parvovírus WUHARV (JX627576). Este vírus, descrito por Handley e colaboradores (2012), foi identificado por análise de metagenómica num macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) que havia sido

infectado experimentalmente com o vírus da imunodeficiência símia e era mantido em cativeiro nos E.U.A.. A sequência obtida da espécie *Macaca fuscata* (macaco-do-japão), amostra ZLX35, apesar de ter um ancestral em comum com as restantes sequências obtidas de hospedeiros do mesmo género, a sua posição dentro do agrupamento não é bem suportada. A posição pouco consistente desta sequência pode ser justificada pela origem geográfica das espécies em questão. Apesar de todos os indivíduos do género *Macaca* terem origem asiática, as espécies *M. silenus* e *M. mulatta* são originárias da Índia, enquanto a espécie *M. fuscata* é oriunda do Japão, pelo que a infecção com vírus diferentes poderá reflectir a infecção natural da espécie e não uma infecção resultante do estado de cativeiro.

As sequências provenientes de hospedeiros da espécie *Cercopithecus ascanius ascanius* (macaco-de-nariz-branco), amostras ZLX59 e ZLX60, são muito semelhantes entre si e próximas dos bufavírus Mfuwe identificado num babuíno-amarelo (*Papio cynocephalus*, LC011424) e Livingstone identificado num babuíno-do-cabo (*Papio ursinus*, LC011423) por Sasaki e colaboradores (2015), ambos ocorrendo no seu habitat selvagem no sul da Zâmbia. É interessante notar que os géneros *Papio* e *Cercopithecus* pertencem a tribos diferentes mas ambos têm origem africana, pelo que a constituição de um grupo monofilético (valor de *bootstrap* de 99%) com as sequências dos vírus de *Cercopithecus ascanius ascanius*, *Papio cynocephalus* e *Papio ursinus* sugere a infecção natural da espécie e não uma transmissão resultante do estado de cativeiro, apesar da proximidade física e possibilidade de contacto entre animais dos géneros *Cercopithecus* e *Macaca*.

O macaco-diana (*Cercopithecus diana*), de onde foi obtida a sequência nucleotídica identificada como ZLX56, pertence à mesma tribo e tem a mesma origem geográfica do macaco-de-nariz-branco. No entanto, pela análise filogenética, ainda que sem suporte de valor de *bootstrap* significativo, estima-se que este vírus esteja mais próximo dos bufavírus de suínos. Um destes vírus foi identificado em fezes de porcos domésticos numa quinta na Áustria (KU867071; Liu *et al.*, 2016b), o outro em porcos domésticos na Hungria, sendo detectado em animais com e sem patologia de paralisia posterior de etiologia desconhecida (KT965075; Hargitai *et al.*, 2016). A sua localização de cativeiro no Jardim Zoológico de Lisboa não permite esclarecer esta questão uma vez

que esta espécie se encontra na mesma zona que outros indivíduos do mesmo género e no alojamento ao lado dos indivíduos da espécie *Macaca silenus*. A grande divergência entre a sequência do macaco-diana e as sequências de hospedeiros do mesmo género novamente poderá ser justificada por estes vírus fazerem parte do viroma destes animais que têm origens geográficas distintas. Apesar de todos terem origem africana, não há sobreposição na distribuição geográfica dos mesmos. A espécie *Cercopithecus diana*, está distribuída desde Serra Leoa até ao Rio Sassandra, na Costa do Marfim, na zona mais a oeste de África e as espécies *Cercopithecus ascanius*, *Papio cynocephalus* e *P. ursinus*, estão distribuídas pela região centro e este do continente (Wilson and Reeder, 2005). No caso de se confirmar tratar-se de um vírus com origem suína, e tratando-se de um vírus entérico, a contaminação alimentar poderá ser uma hipótese a considerar.

Relativamente às sequências de bufavírus obtidas do chimpanzé-comum (ZLX119, ZLX121, ZLX122, ZLX123, ZLX125, ZLX126, ZLX127, ZLX128), surgem estreitamente relacionadas com as de bufavírus humanos formando um grupo monofilético suportado por um valor de *bootstrap* de 100% e que reflecte a proximidade filogenética entre as duas espécies de hospedeiros. À semelhança do que acontece com os bufavírus humanos, observa-se alguma diversidade genética dentro deste grupo de sequências de bufavírus de chimpanzé-comum. A maioria (7/8) surge agrupada de forma significativa com o genótipo HBUV-2 e uma (ZLX123) no seio de sequências das variantes HBUV-1 e HBUV-3, ainda que sem suporte consistente no segundo caso. Os bufavírus foram descobertos em amostras fecais humanas apenas em 2012 e a sua origem evolutiva é ainda desconhecida. Ao identificarem-se estes vírus em grandes símios formando um grupo monofilético com os vírus humanos pode-se colocar a hipótese de um ancestral comum que tenha infectado e co-evoluído com os respectivos hospedeiros. No entanto, também não se pode excluir a transmissão Homem-símio em ambos os sentidos num passado recente. Por outro lado, a descoberta de uma nova estirpe de bufavírus em morcegos da Europa, com obtenção da sequência quase completa do genoma (~3400 b) e análise filogenética, revelou a formação de um grupo monofilético com os bufavírus humanos e o bufavírus WUHARV de macaco-rhesus, sugerindo a existência de ancestrais comuns e uma possível origem nos morcegos para os bufavírus de primatas (Kemenesi *et al.*, 2015). Na árvore filogenética construída (Figura 18), apesar das sequências de bufavírus humanos e de chimpanzé-comum

surgirem agrupadas com as sequências dos vírus de morcegos, não nos foi possível verificar de forma consistente esta relação entre bufavírus humanos e de morcegos, provavelmente devido ao tamanho das sequências nucleotídicas analisadas ser bastante reduzido. Um resultado idêntico a este foi obtido por Sasaki e colaboradores (2016) quando da análise filogenética do mesmo fragmento do gene NS1 de bufavírus de raposas voadoras. O facto de termos conseguido replicar em culturas da linha celular contínua A549 um bufavírus de chimpanzé-comum (ZLX122) facilitará a amplificação e sequenciação do genoma completo deste vírus e subsequente análise filogenética. Ainda, a inclusão na nossa árvore de um número substancialmente maior de sequências de bufavírus, nomeadamente de macacos do Velho Mundo, faz com que a sequência WUHARV de macaco-rhesus surja com um posicionamento muito diferente, *i.e.* associada à maioria das sequências com origem na família de hospedeiros *Cercopithecidae*.

Curiosamente, no agrupamento das sequências de bufavírus de chimpanzé-comum surgem duas sequências provenientes de pequenos mamíferos (ZLX162 de musaranho e ZLX163 de roedor) capturados em armadilhas colocadas na zona das instalações dos símios no Zoo de Lisboa. A similaridade destas sequências com as provenientes dos primatas e o seu posicionamento na árvore, bem afastado das sequências de outros bufavírus identificados em pequenos mamíferos, nomeadamente bufavírus Solwezi e Mpulungu com origem em musaranhos, pode ser interpretada como estas sequências serem resultantes de i) contaminação laboratorial com sequências de primatas durante a amplificação por PCR, ii) contaminação da amostra colhida, iii) contacto dos roedores com fezes dos primatas infectados e ingestão destas ou iv) transmissão de bufavírus inter-espécies. A primeira hipótese é contrariada, ainda que não totalmente excluída, pelo facto dos dois grupos de amostras terem sido processados e analisados em períodos temporais bem distintos separados por um intervalo cinco meses. Durante este tempo foram analisadas outras amostras na tentativa de detectar bufavírus usando os mesmos *primers*, não se tendo verificado qualquer contaminação com bufavírus de chimpanzé-comum. Igualmente, foram testadas quatro amostras de pequenos mamíferos em simultâneo, a amplificação de DNA de bufavírus ocorreu em apenas duas, sendo que os controlos negativos de ambas as reacções não evidenciavam contaminação (ver anexo 6). Por outro lado, o facto de as amostras serem conteúdo intestinal dos animais, e não

fezes colhidas no meio ambiente, torna pouco provável a contaminação da amostra propriamente dita. O simples contacto com fezes de chimpanzé-comum infectado poderá ser responsável pela aquisição do vírus pela via fecal-oral, sem infecção propriamente dita dos pequenos mamíferos, e poderá ser a explicação mais plausível, nomeadamente devido à quantidade reduzida do produto amplificado. No caso de ter havido transmissão inter-espécies e replicação viral nos pequenos mamíferos, provavelmente seria obtido um produto de *nested* PCR mais abundante.

A partir de duas amostras provenientes de gibão-de-mãos-brancas (*Hylobates lar*) foi possível obter duas sequências nucleotídicas semelhantes entre si mas diversas (como se pode ver pelo tamanho dos ramos), formando um grupo monofilético suportado por um valor de *bootstrap* de 100%. As sequências, identificadas como ZLX61 e ZLX62, deram origem a um ramo isolado das restantes sequências de bufavírus incluídas na análise, apontando para uma sequência muito divergente das descritas na literatura. Este posicionamento causa alguma estranheza, uma vez que os gibões fazem parte da família *Hylobatidae* que juntamente com a família *Hominidae*, a qual inclui o Homem, gorilas e chimpanzés, constituem a superfamília *Hominoidea*. Assim, seria expectável uma maior proximidade com as sequências de bufavírus humanos e de chimpanzés se assumirmos que a filogenia destes vírus poderá reflectir a dos respectivos hospedeiros. O facto de os parvovírus darem origem a infecções frequentemente assintomáticas e persistentes, bem como a sua endogeneização, tem sugerido um processo de co-evolução com o hospedeiro (Liu *et al.*, 2011). Por outro lado, poderá colocar-se a possibilidade destes vírus tão distantes resultarem de transmissão inter-espécies. Se for o caso, esta deverá ter ocorrido no ambiente natural desta espécie e não no local de cativeiro, uma vez que o gibão-de-mãos-brancas está restringido a uma área do Zoo de Lisboa rodeada de água. Ainda, é de realçar que é a primeira vez que é identificado um protoparvovírus em primatas da família *Hylobatidae* e considerando o posicionamento das sequências de bufavírus de gibão-de-mãos-brancas na árvore filogenética e a distância entre estas e as dos bufavírus oriundos de outras espécies, é possível que futuramente possam dar origem a uma nova espécie viral dentro do género *Protoparvovirus*.

Os morcegos são mamíferos com uma larga distribuição geográfica e reservatório natural de uma grande diversidade de vírus, alguns dos quais causadores de doenças

graves no Homem e animais e de que são exemplo os filovírus Ébola e Marburgo e os henipavírus (Leroy *et al.*, 2005; Marsh and Wang, 2012). Tradicionalmente, os morcegos são divididos em duas subordens: *Megachiroptera* (“megamorcegos”), vulgarmente conhecidos como raposas voadoras, e *Microchiroptera* (“micromorcegos”) consistindo essencialmente em morcegos frugíferos e insectívoros. Bufavírus ou parvovírus relacionados foram identificados em animais destes dois grupos (Kemenesi *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015; Sasaki *et al.*, 2016). Sete das 14 amostras fecais testadas para bufavírus deram origem a amplicões com o tamanho pretendido (ver anexo 6). Porém, quando da sequenciação, apenas dois foram confirmados como tendo similaridade com parvovírus de morcegos, apontando para uma taxa de detecção de 14,3%, os restantes amplicões sendo provenientes de bactérias (Anexo 6). Uma taxa de detecção mais elevada (38%) foi obtida no mesmo tipo de amostras colhidas na Hungria mas utilizando *primers* específicos de bufavírus de morcegos, desenhados com base numa identificação prévia do genoma viral por metagenómica (Kemenesi *et al.*, 2015). Um estudo realizado na Indonésia com amostras fecais de raposas voadoras (Sasaki *et al.*, 2016) em que foram usados os *primers* genéricos usados no nosso trabalho resultou numa taxa de detecção de 10%, mais próxima dos 14% aqui obtidos. Estes dados sugerem que a frequência destes bufavírus poderá ser mais elevada, dependendo a sua detecção da especificidade dos *primers* usados.

As sequências de bufavírus dos morcegos portugueses (PTM65 e PTM71) estão estreitamente relacionadas entre si e com as sequências de morcegos insectívoros da China (KC154060, KC154061) e da Hungria (KR078344), formando no seu conjunto um grupo isolado suportado por um valor de *bootstrap* de 100%. Este grupo de sequências surge bem afastado das sequências de bufavírus das raposas voadoras da Indonésia (NC_029797, LC085666, LC085667) que representam uma linhagem distinta, como igualmente demonstrado na análise filogenética de Sasaki e colaboradores (2016). Desconhecemos quais as espécies de morcegos portuguesas que estão na origem das sequências de bufavírus obtidas, no entanto estas estão mais próximas das identificadas em morcegos *Myotis ricketti* da China (KC154060), enquanto as sequências provenientes de *Miniopterus schreibersii* da China (KC154061) e da Hungria (KR078344) estão mais estreitamente relacionadas entre si, sugerindo uma filogenia destes vírus associada à do hospedeiro. Porém, a primeira espécie não está

descrita como existente em Portugal. Existem no entanto outras sete espécies do género *Myotis* no nosso país (<http://www.icnf.pt/portal/naturaclas/patrinatur/especies/mam/morc>).

Em conclusão, este trabalho demonstrou uma grande inespecificidade das reacções de PCR usadas na detecção de parvovírus em amostras fecais, designadamente no caso de PARV4 e BoV, decorrente, em parte, dos *primers* degenerados empregues. Detectou-se, por PCR seguido de sequenciação, genoma de parvovírus em amostras fecais de 17% (6/35) das espécies de primatas não humanos em cativeiro no Jardim Zoológico de Lisboa. Foi identificado DNA de BoV em 5,5% (7/128) das amostras, todas provenientes de chimpanzé-comum. As sequências parciais do gene NS1 de BoV analisadas apresentam baixa diversidade genética, reflectindo a origem numa única espécie e a proximidade física dos animais, e permitem incluir estes vírus na espécie *Primate bocaparvovirus 1*.

A presença de DNA de BuV foi detectada em 14,8% (19/128) das amostras, correspondendo a seis espécies símias diferentes (chimpanzé-comum, macaco-do-japão, macaco-diana, macaco-cauda-de-leão, macaco-de-nariz-branco, gibão-de-mãos-brancas) para as quais não estão descritos BuV. As sequências parciais do gene NS1 obtidas apresentam elevada diversidade genética segregando nas árvores filogenéticas maioritariamente de acordo com o grupo taxonómico do hospedeiro de origem. As sequências de BuV de macaco-do-japão, macaco-cauda-de-leão e macaco-de-nariz-branco incluem-se num grupo monofilético de sequências de referência também com origem em espécies de macacos do Velho Mundo, enquanto as de BuV de chimpanzé-comum estão agrupadas com os genótipos de BuV humanos. A sequência de BuV de macaco-diana apresenta um posicionamento pouco ortodoxo na árvore filogenética, surgindo agrupada, ainda que sem suporte significativo, com sequências de BuV de suínos e não com as sequências de BuV de macacos do Velho Mundo. As sequências de BuV gibão-de-mãos-brancas são muito divergentes e estão isoladas das restantes sequências de BuV incluídas na análise filogenética, pelo que poderão vir a constituir um novo genótipo dentro dos bufavírus ou mesmo uma nova espécie dentro do género *Protoparvovirus*. Não se conseguiu detectar vírus do tipo PARV4 nas fezes das espécies símias testadas, nem BoV ou BuV em macacos do Novo Mundo e lémures.

Conseguiu-se ainda demonstrar a replicação de BuV de chimpanzé-comum numa linha celular humana em cultura. Tanto quanto sabemos é a primeira vez que é reportada a multiplicação *in vitro* destes vírus.

Detectou-se DNA de BuV em duas de quatro amostras provenientes de pequenos mamíferos capturados nas instalações dos primatas. As sequências destes vírus são idênticas às obtidas de chimpanzé-comum, o que sugere contaminação laboratorial ou ingestão de resíduos fecais de primata. Duas de catorze amostras fecais provenientes de morcegos revelaram a presença de DNA de BuV. Estas sequências estão estreitamente relacionadas com sequências de BuV de morcegos descritas na literatura e, para esta região do genoma, estão mais próximas das sequências de BuV humanos e de grandes símios que de BuV de raposas-voadoras.

Considerando as dificuldades em obter produtos de PCR específicos na detecção de parvovírus, nomeadamente para PARV4 e BoV, outras condições de amplificação deverão ser testadas através do desenho de novos *primers* com base em alinhamentos que incluam sequências nucleotídicas adicionais entretanto disponibilizadas. Igualmente o tratamento com DNase das amostras filtradas, como passo prévio à extracção do DNA viral, poderá reduzir a complexidade do DNA matriz e facilitar a detecção de DNA viral. Ainda, uma vez que houve a necessidade de limitar a identificação de parvovírus por sequenciação, apenas foi confirmada a sua presença num conjunto de amostras potencialmente positivas por PCR, pelo que a análise deverá ser expandida às demais amostras. Da mesma forma, apenas foram sequenciados alguns clones, no caso das amostras cujos clones sequenciados não deram origem a sequências de parvovírus, deverão ser sequenciados outros.

Os BuV humanos foram descobertos muito recentemente e o número destes vírus/sequências nucleotídicas com origem em primatas não humanos é muito limitado. Ao identificarmos pela primeira vez DNA de BuV nas seis espécies de primatas acima referidas, pensamos ser importante proceder à sequenciação do genoma completo destes vírus. Deverá ser dada maior prioridade aos BuV de gibão-de-mãos-brancas e do macaco-diana pela divergência da sua sequência nucleotídica e posicionamento na árvore filogenética construída. Tal permitirá estabelecer com maior segurança relações filogenéticas, analisar a sua história evolutiva e caracterizar o seu genoma em termos de

regulação da transcrição (*e.g.* promotores, locais de *splicing*, sinais de poliadenilação) e proteínas auxiliares codificadas. Por outro lado, os parvovírus são muito propensos à recombinação e a análise dos genomas completos permitirá identificar eventos de recombinação.

No sentido de determinar possíveis transmissões inter-espécies, seria também interessante a pesquisa dos parvovírus BoV e BuV em amostras fecais dos tratadores dos primatas em cativeiro no Jardim Zoológico de Lisboa.

5. Referências Bibliográficas

Abdel-Moneim, A., Kamel, M., Hamed, D., Hassan, S., Soliman, M., Al-Quraishy, S. and El Kholy, A. (2016) 'A novel primer set for improved direct gene sequencing of human bocavirus genotype-1 from clinical samples', *Journal of Virological Methods*, 228, pp.108-113.

Adlhoch, C., Kaiser, M., Loewa, A., Ulrich, M., Forbrig, C., Adjogoua, E. V., Akoua-Koffi, C., Couacy-Hymann, E., Leendertz, S. A. J., Rietschel, W., Boesch, C., Ellerbrok, H., Schneider, B. S. and Leendertz, F. H. (2012) 'Diversity of Parvovirus 4-like Viruses in Humans, Chimpanzees, and Monkeys in Hunter-Prey Relationships', *Emerging Infectious Diseases*, 18(5).

Allander, T., Tammi, M., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A. and Andersson, B. (2005) 'Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(36), pp.12891-12896.

Altay, A., Yahiro, T., Bozdayi, G., Matsumoto, T., Sahin, F., Ozkan, S., Nishizono, A., Söderlund-Venermo, M. and Ahmed, K. (2015) 'Bufavirus genotype 3 in Turkish children with severe diarrhoea', *Clinical Microbiology and Infection*, 21, pp.965.e1-965.e4.

Angelova, A., Geletneky, K., Nüesch, J. and Rommelaere, J. (2015) 'Tumor Selectivity of Oncolytic Parvoviruses: From in vitro and Animal Models to Cancer Patients', *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 3(55).

Arthur, J., Higgins, G., Davidson, G., Givney, R. and Ratcliff, R. (2009) 'A Novel Bocavirus Associated with Acute Gastroenteritis in Australian Children', *PLoS Pathog*, 5(4).

Babkin, I., Tyumentsev, A., Tikunov, A., Kurilshikov, A., Ryabchikova, E., Zhirakovskaya, E., Netesov, S. and Tikunova, N. (2013) 'Evolutionary time-scale of primate bocaviruses', *Infection, Genetics and Evolution*, 14, pp.265-274.

- Bär, S., Rommelaere, J. and Nüesch, J.P.F. (2013) 'Vesicular Transport of Progeny Parvovirus Particles through ER and Golgi Regulates Maturation and Cytolysis', *PLoS Pathog*, 9(9), e1003605.
- Berns, K.I. and Parrish, C.R. (2013) 'Parvoviridae', in Knipe, D. and Howley, P. (eds.) *Fields Virology*. 6th edn. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2, pp.1768-1791.
- Berry, M., Gamiieldien, J. and Fielding, B. (2015) 'Identification of New Respiratory Viruses in the New Millennium', *Viruses*, 7, pp.996-1019.
- Brown, K. (2010) 'The expanding range of parvoviruses which infect humans', *Rev. Med. Virol.*, 20, pp.231-244.
- Brožová, K., Hrazdilová, K., Slaninková, E., Modrý, D., Černý, J. and Celer, V. (2016) 'Genetic and phylogenetic characterization of novel bocaparvovirus infecting chimpanzee', *Infection, Genetics and Evolution*, 37, pp.231-236.
- Canuti, M., Eis-Huebinger, A., Deijs, M., de Vries, M., Drexler, J., Oppong, S., Müller, M., Klose, S., Wellinghausen, N., Cottontail, V., Kalko, E., Drosten, C. and van der Hoek, L. (2011) 'Two Novel Parvoviruses in Frugivorous New and Old World Bats', *PLoS ONE*, 6(12), p.e29140.
- Cashman, O. and O'Shea, H. (2012) 'Detection of human bocaviruses 1, 2 and 3 in Irish children presenting with gastroenteritis', *Arch Virol*, 157(9), pp. 1767–1773.
- Chen, A. Y. and Qiu, J. (2010) 'Parvovirus infection-induced cell death and cell cycle arrest', *Future Virol.*, 5(6), pp.731–743.
- Chen, A.Y., Zhang, E.Y., Guan, W., Cheng, F., Kleiboeker, S., Yankee, T.M. and Qiu, J. (2010) 'The small 11kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells', *Blood*, 115(5), pp.1070–1080.
- Cheng, W., Chen, J., Xu, Z., Yu, J., Huang, C., Jin, M., Li, H., Zhang, M., Jin, Y. and Duan, Z. (2011) 'Phylogenetic and recombination analysis of human bocavirus 2', *BMC Infectious Diseases*, 11(50).

- Chieochansin, T., Vutithanachot, V., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. (2015) 'Bufavirus in fecal specimens of patients with and without diarrhea in Thailand', *Arch Virol*, 160, pp.1781-1784.
- Cossart, Y.E., Field, A.M., Cant, B. and Widdows, D. (1975) 'Parvovirus-like particles in human sera', *Lancet*, 1, pp.72–73.
- Cotmore, S. and Tattersall, P. (2014) 'Parvoviruses: Small Does Not Mean Simple', *Annual Review of Virology*, 1(1), pp.517-537.
- Cotmore, S., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J., Mukha, D., Pintel, D., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D. and Davison, A. (2014) 'The family *Parvoviridae*', *Arch Virol*, 159(5), pp.1239-1247.
- Deng, X., Yan, Z., Cheng, F., Engelhardt, J. and Qiu, J. (2016) 'Replication of an Autonomous Human Parvovirus in Non-dividing Human Airway Epithelium Is Facilitated through the DNA Damage and Repair Pathways', *PLoS Pathog*, 12(1), p.e1005399.
- Dijkman, R., Koekkoek, S.M., Molenkamp, R., Schildgen, O. and van der Hoek, L. (2009) 'Human Bocavirus Can Be Cultured in Differentiated Human Airway Epithelial Cells', *Journal of Virology*, 83(15), pp. 7739–7748.
- Dorsch, S., Liebisch, G., Kaufmann, B., von Landenberg, P., Hoffmann, J.H., Drobnik, W. and Modrow, S. (2002) 'The VP1 Unique Region of Parvovirus B19 and Its Constituent Phospholipase A2-Like Activity', *Journal of virology*, 76(4), pp.2014–2018.
- Drexler, J.F., Reber, U., Muth, D., Herzog, P., Annan, A., Ebach, F., Sarpong, N., Acquah, S., Adlkofer, J., Adu-Sarkodie, Y., Panning, M., Tannich, E., May, J., Drosten, C. and Eis-Hübinger, A.M. (2012) 'Human parvovirus 4 in nasal and fecal specimens from children, Ghana', *Emerg Infect Dis.*, 18(10), pp.1650-3
- Duffy, S., Shackelton L.A. and Holmes, E.C. (2008) 'Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants', *Nature Reviews Genetics*, 9, pp.267-276.

- Engelsma, D., Valle, N., Fish, A., Salomé, N., Almendral, J. M. and Fornerod, M. (2008) 'A Supraphysiological Nuclear Export Signal Is Required for Parvovirus Nuclear Export', *Molecular Biology of the Cell*, 19, pp. 2544–2552.
- Fasina, O.O., Dong, Y. and Pintel, D.J. (2016) 'NP1 Protein of the Bocaparvovirus Minute Virus of Canines Controls Access to the Viral Capsid Genes via Its Role in RNA Processing', *J Virol.*, 90(4), pp.1718-1728.
- Fay, N. and Panté, N. (2015) 'Old foes, new understandings: nuclear entry of small non-enveloped DNA viruses', *Current Opinion in Virology*, 12, pp.59-65.
- Felsenstein, J. (1985) 'Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap', *Evolution*, 39, pp.783-791.
- Fu, X., Wang, X., Ni, B., Shen, H., Wang, H., Zhang, X., Chen, S., Shao, S., and Zhang, W. (2011) 'Recombination analysis based on the complete genome of bocavirus', *Virology Journal*, 8(182).
- Ge, X., Li, Y., Yang, X., Zhang, H., Zhou, P., Zhang, Y. and Shia, Z. (2012) 'Metagenomic Analysis of Viruses from Bat Fecal Samples Reveals Many Novel Viruses in Insectivorous Bats in China', *Journal of Virology*, 86(8), pp. 4620 – 4630.
- Guido, M., Tumolo, M. R., Verri, T., Romano, A., Serio, F., De Giorgi, M., De Donno, A., Bagordo, F. and Zizza, A. (2016) 'Human bocavirus: Current knowledge and future challenges', *World J Gastroenterol*, 22(39), pp. 8684-8697.
- Handley, S., Thackray, L., Zhao, G., Presti, R., Miller, A., Droit, L., Abbink, P., Maxfield, L., Kambal, A., Duan, E., Stanley, K., Kramer, J., Macri, S., Permar, S., Schmitz, J., Mansfield, K., Brenchley, J., Veazey, R., Stappenbeck, T., Wang, D., Barouch, D. and Virgin, H. (2012) 'Pathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infection Is Associated with Expansion of the Enteric Virome', *Cell*, 151(2), pp.253-266.
- Hargitai, R., Pankovics, P., Kertész, A., Bíró, H., Boros, Á., Phan, T., Delwart, E. and Reuter, G. (2016) 'Detection and genetic characterization of a novel parvovirus

distantly related to human bufavirus in domestic pigs', *Arch Virol*, 161(4), pp.1033-1037.

He, B., Li, Z., Yang, F., Zheng, J., Feng, Y., Guo, H., Li, Y., Wang, Y., Su, N., Zhang, F., Fan, Q. and Tu, C. (2013) 'Virome Profiling of Bats from Myanmar by Metagenomic Analysis of Tissue Samples Reveals More Novel Mammalian Viruses', *PLoS ONE*, 8(4), p.e61950.

Huang, L., Halder, S. and Agbandje-McKenna, M. (2014) 'Parvovirus Glycan Interactions', *Curr Opin Virol.*, pp.108–118.

Huang, D., Wang, W., Lu, Q., Zhao, J., Guo, C., Wang, H., Zhang, X., Tong, Y., Liu, W. and Cao, W. (2015) 'Identification of Bufavirus-1 and Bufavirus-3 in Feces of Patients with Acute Diarrhea, China', *Sci. Rep.*, 5, p.13272.

ICTV. Disponível em <https://talk.ictvonline.org> (Acedido: Janeiro 2017).

Jones, M., Kapoor, A., Lukashov, V., Simmonds, P., Hecht, F. and Delwart, E. (2005) 'New DNA Viruses Identified in Patients with Acute Viral Infection Syndrome', *Journal of Virology*, 79, pp.8230-8236.

Kantola, K., Hedman, L., Arthur, J., Alibeto, A., Delwart, E., Jartti, T., Ruuskanen, O., Hedman, K. and Söderlund-Venermo, M. (2011) 'Seroepidemiology of Human Bocaviruses 1–4', *The Journal of Infectious Diseases*, 204, pp.1403–12.

Kapoor, A., Slikas, E., Simmonds, P., Chieochansin, T., Naeem, A., Shaukat, S., Alam, M., Sharif, S., Angez, M., Zaidi, S. and Delwart, E. (2009) 'A Newly Identified Bocavirus Species in Human Stool', *The Journal of Infectious Diseases*, 199(2), pp.196-200.

Kapoor, A., Mehta, N., Esper, F., Poljsak-Prijatelj, M., Quan, P., Qaisar, N., Delwart, E. and Lipkin, W. (2010a) 'Identification and Characterization of a New Bocavirus Species in Gorillas', *PLoS ONE*, 5(7), p.e11948.

Kapoor, A., Simmonds, P., Slikas, E., Li, L., Bodhidatta, L., Sethabutr, O., Triki, H., Bahri, O., Oderinde, B., Baba, M., Bukbuk, D., Besser, J., Bartkus, J. and Delwart, E. (2010b) 'Human Bocaviruses Are Highly Diverse, Dispersed, Recombination Prone,

and Prevalent in Enteric Infections’, *The Journal of Infectious Diseases*, 201(11), pp.1633-1643.

Kemenesi, G., Dallos, B., Görföl, T., Estók, P., Boldogh, S., Kurucz, K., Oldal, M., Marton, S., Bányai, K. and Jakab, F. (2015) ‘Genetic diversity and recombination within bufaviruses: Detection of a novel strain in Hungarian bats’, *Infection, Genetics and Evolution*, 33, pp.288-292.

Kimura, M. (1980) ‘A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences’, *Journal of Molecular Evolution*, 16, pp.111-120.

Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Tse, H., Fu, C.T.Y., Au, W., Chen, X., Tsoi, H., Tsang, T.H.F., Chan, J.S.Y., Tsang, D.N.C., Li, K.S.M., Tse, C.W.S., Ng, T., Tsang, O.T.Y., Zheng, B., Tam, S., Chan, K., Zhou, B. and Yuen, K. (2008) ‘Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4’, *Journal of General Virology*, 89, pp. 1840–1848.

Lederman, M., Patton, J.T., Stout, E.R. and Bates, R.C. (1984) ‘Virally Coded Noncapsid Protein Associated with Bovine Parvovirus Infection’, *Journal of Virology*, 49(2), pp.315-318.

Leroy, E.M., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., Délicat, A., Paweska, J.T., Gonzalez, J. and Swanepoel, R. (2005) ‘Fruit bats as reservoirs of Ebola virus’, *Nature*, 438, pp. 575-576.

Liu, H., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S.A., Li, G., Peng, Y., Yi, X. and Jiang, D. (2011) ‘Widespread Endogenization of Densoviruses and Parvoviruses in Animal and Human Genomes’, *Journal of Virology*, 85(19), pp.9863–9876.

Liu, Q., Zhang, Z., Zheng, Z., Zheng, C., Liu, Y., Hu, Q., Ke, X. and Wang, H. (2016a) ‘Human Bocavirus NS1 and NS1-70 Proteins Inhibit TNF- α -Mediated Activation of NF- κ B by targeting p65’, *Scientific Reports*, 6:28481.

- Liu, L., Schwarz, L., Ullman, K., Ahola, H., Qiu, Y., Ma, Z. and Hennig-Pauka, I. (2016b) 'Identification of a novel bufavirus in domestic pigs by a viral metagenomic approach', *J. Gen. Virol.*, 97, pp.1592-1596.
- Lukashov, V.V. and Goudsmit, J. (2001) 'Evolutionary Relationships among Parvoviruses: Virus-Host Coevolution among Autonomous Primate Parvoviruses and Links between Adeno-Associated and Avian Parvoviruses', *Journal of Virology*, 75(6), pp.2729-2740.
- Malecki, M., Schildgen, V. and Schildgen, O. (2011) 'Human bocavirus: still more questions than answers', *Future Virol.*, 6(9), pp.1107-1114.
- Manning, A., Willey, S.J., Bell, J.E. and Simmonds, P. (2007) 'Comparison of tissue distribution, persistence, and molecular epidemiology of parvovirus B19 and novel human parvoviruses PARV4 and human bocavirus', *J Infect Dis.*, 195(9), pp.1345-52.
- Manteufel, J. and Truyen, U. (2008) 'Animal Bocaviruses: A Brief Review', *Intervirolgy*, 51, pp.328-334.
- Marchini, A., Bonifati, S., Scott, E.M., Angelova A.L. and Rommelaere, J. (2015) 'Oncolytic parvoviruses: from basic virology to clinical applications', *Virology Journal*, 12(6).
- Maroto, B., Valle, N., Saffrich, R. and Almendral, J.M. (2004) 'Nuclear export of the nonenveloped parvovirus virion is directed by an unordered protein signal exposed on the capsid surface', *J Virol.*, 78(19), pp.10685-94.
- Marsh, G.A., de Jong, C., Barr, J.A., Tachedjian, M., Smith, C., Middleton, D., Yu, M., Todd, S., Foord, A.J., Haring, V., Payne, J., Robinson, R., Broz, I., Cramer, G., Field, H.E. and Wang, L. (2012) 'Cedar Virus: A Novel Henipavirus Isolated from Australian Bats', *PLoS Pathog*, 8(8), e1002836.
- Matthews, P., Malik, A., Simmons, R., Sharp, C., Simmonds, P. and Klennerman, P. (2014) 'PARV4: An Emerging Tetraparvovirus', *PLoS Pathog*, 10(5), p.e1004036.

- Mihaylov, I.S., Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (2014) 'Complementation for an essential ancillary nonstructural protein function across parvovirus genera', *Virology*, pp.226–237.
- Naumer, M., Sonntag, F., Schmidt, K., Nieto, K., Panke, C., Davey, N. E., Popa-Wagner, R., Kleinschmidt, J. A. (2012) 'Properties of the Adeno-Associated Virus Assembly-Activating Protein', *Journal of Virology*, 86(23), pp.13038–13048.
- Norkin, L. (2010) *Virology, Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington, DC: ASM Press, pp.362-377.
- Ohshima, T. and Mochizuki, M. (2009) 'Evidence for recombination between feline panleukopenia virus and canine parvovirus type 2', *J Vet Med Sci.*, 71(4), pp.403-408.
- Ong, D., Schuurman, R. and Heikens, E. (2016) 'Human bocavirus in stool: A true pathogen or an innocent bystander?', *Journal of Clinical Virology*, 74, pp.45-49.
- Palermo, L.M., Hafenstein, S.L. and Parrish, C.R. (2006) 'Purified Feline and Canine Transferrin Receptors Reveal Complex Interactions with the Capsids of Canine and Feline Parvoviruses That Correspond to Their Host Ranges', *Journal of Virology*, 80(17), pp.8482–8492.
- Parrish, C. R. (1999) 'Host range relationships and the evolution of canine parvovirus', *Vet. Microbiol.*, 69, pp.29–40.
- Phan, T., Vo, N., Bonkougou, I., Kapoor, A., Barro, N., O'Ryan, M., Kapusinszky, B., Wang, C. and Delwart, E. (2012) 'Acute Diarrhea in West African Children: Diverse Enteric Viruses and a Novel Parvovirus Genus', *Journal of Virology*, 86(20), pp.11024-11030.
- Phan, T., Sdiri-Loulizi, K., Aouni, M., Ambert-Balay, K., Pothier, P., Deng, X. and Delwart, E. (2014) 'New Parvovirus in Child with Unexplained Diarrhea, Tunisia', *Emerg. Infect. Dis.*, 20(11), pp.1911-1913.
- Phan, T.G., Gulland, F., Simeone, C., Deng, X. and Delwart, E. (2015) 'Sesavirus: prototype of a new parvovirus genus in feces of a sea lion', *Virus genes*, 50(1), pp.134-136.

- Rocha, G. (2014) 'Parvovírus e Bocavírus', in Barroso, H., Meliço-Silvestre, A. and Taveira, N. (eds.) *Microbiologia médica*. Lisboa: Lidel.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) 'The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees', *Molecular Biology and Evolution*, 4, pp.406-425.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(12), pp.5463-5467.
- Sasaki, M., Orba, Y., Anindita, P., Ishii, A., Ueno, K., Hang'ombe, B., Mweene, A., Ito, K. and Sawa, H. (2015) 'Distinct Lineages of Bufavirus in Wild Shrews and Nonhuman Primates', *Emerg. Infect. Dis.*, 21(7), pp.1230-1233.
- Sasaki, M., Gonzalez, G., Wada, Y., Setiyono, A., Handharyani, E., Rahmadani, I., Taha, S., Adiani, S., Latief, M., Kholilullah, Z. A., Subangkit, M., Kobayashi, S., Nakamura, I., Kimura, T., Orba, Y., Ito, K. and Sawa, H. (2016) 'Divergent bufavirus harboured in megabats represents a new lineage of parvoviruses', *Scientific Reports*, 6, pp.24257.
- Schildgen, O. (2013) 'Human Bocavirus: Lessons Learned to Date', *Pathogens*, 2, pp.1-12.
- Schneider, B., Fryer, J.F., Reber, U., Fischer, H.P., Tolba, R.H., Baylis, S.A. and Eis-Hübinger, A.M. (2008) 'Persistence of novel human parvovirus PARV4 in liver tissue of adults', *J Med Virol.*, 80(2), pp. 345-351.
- Schwartz, D., Green, B., Carmichael, L.E. and Parrish, C.R. (2002) 'The Canine Minute Virus (Minute Virus of Canines) Is a Distinct Parvovirus That Is Most Similar to Bovine Parvovirus', *Virology*, 302, pp.219-223.
- Shackelton, L.A., Hoelzer, K., Parrish, C.R. and Holmes, E. C. (2007) 'Comparative analysis reveals frequent recombination in the parvoviruses', *J Gen Virol.*, 88(12), pp.3294-3301.
- Sharp, C., LeBreton, M., Kantola, K., Nana, A., Diffo, J., Djoko, C., Tamoufe, U., Kiyang, J., Babila, T., Ngole, E., Pybus, O., Delwart, E., Delaporte, E., Peeters, M., Soderlund-Venermo, M., Hedman, K., Wolfe, N. and Simmonds, P. (2010) 'Widespread Infection with Homologues of Human Parvoviruses B19, PARV4, and

Human Bocavirus of Chimpanzees and Gorillas in the Wild’, *Journal of Virology*, 84(19), pp.10289-10296.

Shen, W., Deng, X., Zou, W., Cheng, F., Engelhardt, J., Yan, Z. and Qiu, J. (2015) ‘Identification and Functional Analysis of Novel Nonstructural Proteins of Human Bocavirus 1’, *J. Virol.*, 89(19), pp.10097-10109.

Simmons, R., Sharp, C., McClure, C.P., Rohrbach, J., Kovari, H., Frangou, E., Simmonds, P., Irving, W., Rauch, A., Bowness, P., Klennerman, P. and the Swiss HIV Cohort Study (2012) ‘Parvovirus 4 Infection and Clinical Outcome in High-Risk Populations’, *The Journal of Infectious Diseases*, 205, pp.1816–1820.

Smits, S., Schapendonk, C., van Beek, J., Vennema, H., Schürch, A., Schipper, D., Bodewes, R., Haagmans, B., Osterhaus, A. and Koopmans, M. (2014) ‘New Viruses in Idiopathic Human Diarrhea Cases, the Netherlands’, *Emerg. Infect. Dis.*, 20(7), pp.1218-1222.

Snoussi, K. and Kann, M. (2014) ‘Interaction of parvoviruses with the nuclear envelope’, *Advances in Biological Regulation*, 54, pp.39-49.

Strauss, J.H. and Strauss E.G. (2002) *Viruses and Human Disease*. 2nd edn. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, pp. 314-320.

Suikkanen, S. (2003) *Cell Biology of Canine Parvovirus Entry*. Thesis, University of Jyväskylä.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011) ‘MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods’, *Molecular Biology and Evolution* (In Press).

Tong, R., Shen, L., Yin, W., Zhou, W., Lu, J., Zheng, M., Bi, S., Lou, Y. and Tan, W. (2013) ‘Prevalence of Human Parvovirus B19, Bocavirus, and PARV4 in Blood Samples from the General Population of China and Lack of a Correlation between Parvovirus and Hepatitis B Co-Infection’, *PLoS ONE*, 8(5), p.e64391.

- Tse, H., Tsoi, H., Teng, J.L.L., Chen, X., Liu, H., Zhou, B., Zheng, B., Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P. and Yuen, K. (2011) 'Discovery and Genomic Characterization of a Novel Ovine Parvovirus and a New Genotype of Bovine Parvovirus', *PLoS ONE*, 6(9), e25619.
- Tu, M., Liu, F., Chen, S., Wang, M. and Cheng, A. (2015) 'Role of capsid proteins in parvoviruses infection', *Virology Journal*, 12(114).
- Tyumentsev, A., Tikunov, A., Zhirakovskaia, E., Kurilshchikov, A., Babkin, I., Klemesheva, V., Netesov, S. and Tikunova, N. (2016) 'Human bocavirus in hospitalized children with acute gastroenteritis in Russia from 2010 to 2012', *Infection, Genetics and Evolution*, 37, pp.143-149.
- Väisänen, E., Kuisma, I., Phan, T., Delwart, E., Lappalainen, M., Tarkka, E., Hedman, K. and Söderlund-Venermo, M. (2014a) 'Bufavirus in Feces of Patients with Gastroenteritis, Finland', *Emerg. Infect. Dis.*, 20(6), pp.1077-1079.
- Väisänen, E., Lahtinen, A., Eis-Hübing, A., Lappalainen, M., Hedman, K. and Söderlund-Venermo, M. (2014b) 'A two-step real-time PCR assay for quantitation and genotyping of human parvovirus 4', *Journal of Virological Methods*, 195, pp.106-111.
- Viral Zone*. Disponível em http://viralzone.expasy.org/all_by_species/103.html (Acedido: Janeiro 2017).
- Wan, C.H., Söderlund-Venermo, M., Pintel, D.J. and Riley, L.K. (2002) 'Molecular characterization of three newly recognized rat parvoviruses', *Journal of General Virology*, 83, pp.2075-2083.
- Wang, J., Cheng, S., Yi, L., Cheng, Y., Yang, S., Xu, H., Zhao, H., Yan, X. and Wu, H. (2012) 'Evidence for natural recombination between mink enteritis virus and canine parvovirus', *Virology Journal*, 9(252).
- Wilson, D.E. and Reeder, D.A.M. (2005) *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. Disponível em <http://www.departments.bucknell.edu/biology/resources/msw3/> (Acedido: Janeiro 2017).

- Wu, Z., Yang, L., Ren, X., He, G., Zhang, J., Yang, J., Qian, Z., Dong, J., Sun, L., Zhu, Y., Du, J., Yang, F., Zhang, S. and Jin, Q. (2016) 'Deciphering the bat virome catalog to better understand the ecological diversity of bat viruses and the bat origin of emerging infectious diseases', *ISME J.*, 10(3), pp. 609-20.
- Yahiro, T., Wangchuk, S., Tshering, K., Bandhari, P., Zangmo, S., Dorji, T., Tshering, K., Matsumoto, T., Nishizono, A., Söderlund-Venermo, M. and Ahmed, K. (2014) 'Novel Human Bufavirus Genotype 3 in Children with Severe Diarrhea, Bhutan', *Emerg. Infect. Dis.*, 20(6), pp.1037-1039.
- Yang, S., Liu, D., Wang, Y., Qu, F., He, Y., Sun, Z., Shen, Q., Li, W., Fu, X., Deng, X., Zhang, W. and Delwart, E. (2015) 'Bufavirus Protoparvovirus in feces of wild rats in China', *Virus Genes*, 52(1), pp.130-133.
- Yang, S., Liu, Z., Wang, Y., Li, W., Fu, X., Lin, Y., Shen, Q., Wang, X., Wang, H. and Zhang, W. (2016) 'A novel rodent Chapparravirus in feces of wild rats', *Virology Journal*, 13.
- Yoo, S., Sunwoo, S., Ko, S., Je, S., Lee, D. and Lyoo, Y. (2015) 'A novel porcine bocavirus harbors a variant NP gene', *SpringerPlus*, 4(1), pp.2-6.
- Yu, X., Zhang, J., Hong, L., Wang, J., Yuan, Z., Zhang, X., and Ghildyal, R. (2012) 'High Prevalence of Human Parvovirus 4 Infection in HBV and HCV Infected Individuals in Shanghai', *PLoS ONE*, 7(1), e29474.
- Zádori, Z., Szelei, J. and Tijssen, P. (2005) 'SAT: a Late NS Protein of Porcine Parvovirus', *Journal of Virology*, 79(20), pp.13129–13138
- Zhang, R., Fang, L., Wu, W., Zhao, F., Song, T., Xie, L., Li, Y., Chen, H. and Xiao, S. (2016) 'Porcine bocavirus NP1 protein suppresses type 1 IFN production by interfering with IRF3 DNA-binding activity', *Virus genes*.
- Zhi, N., Mills, I.P., Lu, J., Wong, S., Filippone, C. and Brown, K.E. (2006) 'Molecular and Functional Analyses of a Human Parvovirus B19 Infectious Clone Demonstrates Essential Roles for NS1, VP1, and the 11-Kilodalton Protein in Virus Replication and Infectivity', *Journal of Virology*, 80(12), pp.5941–5950.

6. Anexos

6.1. Anexo 1

	Nome comum	Nome científico	Número de amostras	
Macacos do Novo Mundo	Saguim-bicolor	<i>Saguinus bicolor</i>	2	40
	Saguim-comum	<i>Callithrix jacchus</i>	2	
	Saguim-de-face-branca	<i>Callithrix geoffroyi</i>	1	
	Saguim-imperador	<i>Saguinus imperator subgriseus</i>	2	
	Saguim-cabeça-de-algodão	<i>Saguinus oedipus</i>	2	
	Saguim-de-mãos-douradas	<i>Saguinus midas</i>	2	
	Indeterminado*		1	
	Mico-leão-dourado	<i>Leontopithecus rosalia</i>	3	
	Mico-leão-de-juba-dourada	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	1	
	Saimiri-da-bolívia	<i>Saimiri boliviensis</i>	5	
	Macaco-uivador-preto	<i>Alouatta caraya</i>	2	
	Macaco-aranha-da-Colômbia	<i>Ateles fusciceps rufiventris</i>	5	
	Macaco-capuchinho-de-peito-amarelo	<i>Cebus xanthosternus</i>	5	
	Macaco-fidalguinho	<i>Cebus apella</i>	3	
	Macaco-de-goeldi	<i>Callimico goeldii</i>	4	
Macacos do Velho Mundo	Langur-de-Java	<i>Trachypithecus auratus auratus</i>	5	48
	Colobo-guereza-kikuyu	<i>Colobus guereza kikuyuensis</i>	5	
	Babuíno-hamadrias	<i>Papio hamadryas</i>	10	
	Macaco-do-japão	<i>Macaca fuscata</i>	10	
	Macaco-cauda-de-leão	<i>Macaca silenus</i>	5	
	Macaco-de-nariz-branco	<i>Cercopithecus ascanius ascanius</i>	4	
	Macaco-de-brazza	<i>Cercopithecus neglectus</i>	5	
	Macaco-diana	<i>Cercopithecus diana</i>	2	
	Macaco-de-beiço-branco	<i>Cercopithecus cephus</i>	1	
	Macaco-testiverde	<i>Chlorocebus cynosuros</i>	1	
Gibões	Siamango	<i>Symphalangus syndactylus</i>	2	6
	Gibão-de-mãos-brancas	<i>Hylobates lar</i>	4	
Lémures	Lémure-de-cauda-anelada	<i>Lemur catta</i>	5	17
	Lémure-preto	<i>Eulemur macaco macaco</i>	4	
	Lémure-preto-e-branco-de-colar	<i>Varecia variegata variegata</i>	5	
	Lémure-de-fronte-branca	<i>Eulemur albifrons</i>	2	
	Lémure-vermelho	<i>Varecia rubra</i>	1	
Grandes Símios	Gorila-ocidental-das-terras-baixas	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	3	17
	Orangutango-de-sumatra	<i>Pongo abelii</i>	4	
	Chimpanzé	<i>Pan troglodytes</i>	10	
		35		128

Descrição das amostras de primatas não humanos estudadas.

*Indeterminado = Animais em coabitação nomeadamente Mico leão dourado (*Leontopithecus rosalia*) e Saguim tufo negro (*Callithrix penicillata*).

6.2. Anexo 2

Resultados preliminares da detecção dos parvovírus em estudo através da amplificação do gene NS1 por PCR a partir de amostras fecais. São identificados os símios estudados com o número identificativo de cada amostra fecal e as taxas de detecção presuntivas para cada um dos vírus. O símbolo + representa a presença do produto de PCR com o tamanho esperado e o símbolo – representa a ausência do mesmo.

	Nome comum	Amostra	PARV4	BoV	BuV
Macacos do Novo Mundo	Saguim-bicolor	9	-	-	-
		16	-	+	-
	Saguim-comum	76	-	-	-
		77	-	-	-
	Saguim-de-face-branca	15	-	+	-
	Saguim-imperador	18	-	+	-
		19	-	+	-
	Saguim-cabeça-de-algodão	3	-	-	-
		49	-	-	-
	Saguim-de-mãos-douradas	70	-	-	-
		71	-	-	-
	Indeterminado*	2	-	-	-
	Mico-leão-dourado	78	-	-	-
		79	-	-	-
		80	-	-	-
	Mico-leão-de-juba-dourada	10	+	-	+
	Saimiri-da-bolívia	86	+	-	-
		87	-	-	-
		90	-	-	-
		93	-	-	-
		94	-	-	-
	Macaco-uivador-preto	1	-	-	-
		11	-	-	-
	Macaco-aranha-da-colômbia	42	-	-	-
		43	-	-	-
		44	-	-	-
		46	-	-	-
		51	-	-	-
	Macaco-capuchinho-de-peito-amarelo	65	-	-	-
		66	-	-	-
		67	-	-	-
		68	-	-	-
		69	-	-	-
	Macaco-fidalguinho	72	-	-	-
		73	-	-	-
		74	-	+	-
	Macaco-de-goeldi	82	-	-	-
		84	-	-	-
		88	-	+	-
		91	-	-	-

Nome comum		Amostra	PARV4	BoV	BuV
Macacos do Velho Mundo	Langur-de-Java	6	-	-	-
		7	-	-	-
		12	-	-	-
		17	-	-	-
		20	-	-	-
	Colobo-guereza-kikuyu	81	-	-	-
		83	-	-	-
		85	-	-	-
		89	-	-	-
		92	-	-	-
	Babuino-hamadrias	21	+	+	-
		22	+	+	-
		23	+	+	-
		24	+	-	-
		25	-	-	-
		26	-	+	-
		27	+	-	-
		28	+	-	-
		29	+	-	-
		30	+	-	-
	Macaco-do-japão	31	+	-	-
		32	-	+	-
		33	-	+	-
		34	-	+	-
		35	-	+	+
		36	+	+	-
		37	-	-	-
		38	+	-	-
		39	-	+	-
		40	-	+	-
	Macaco-cauda-de-leão	52	-	-	+
		54	-	+	+
		55	-	-	+
		57	-	+	+
		58	-	+	+
	Macaco-de-nariz-branco	4	-	-	-
		14	-	+	-
		59	-	-	+
		60	-	-	+
	Macaco-de-brazza	8	-	-	+
		41	-	-	-
		47	-	-	-
		48	-	-	-
		50	-	-	-
	Macaco-diana	53	-	-	-
		56	-	-	+
	Macaco-de-beiço-branco	13	-	-	-
	Macaco-testiverde	5	-	-	+

	Nome comum	Amostra	PARV4	BoV	BuV
Gibões	Siamango	45	-	-	-
		75	+	-	-
	Gibão-de-mãos-brancas	61	+	-	+
		62	-	+	+
		63	-	-	-
64		+	-	-	
Lémures	Lémure-de-cauda-anelada	95	-	-	-
		96	-	-	-
		97	+	-	-
		98	-	-	-
		99	-	+	-
	Lémure-preto	100	-	-	-
		101	-	+	-
		102	-	+	-
		103	-	+	-
	Lémure-preto-e-branco-de-colar	104	-	+	-
		105	-	+	-
		106	-	-	-
		107	-	+	-
	Lémure-de-fronte-branca	108	-	-	-
		109	-	-	-
		111	-	+	-
	Lémure-vermelho	110	-	+	-
Grandes Símios	Gorila-ocidental-das-terras-baixas	112	-	-	-
		113	-	-	-
		114	-	-	-
	Orangutango-de-sumatra	115	-	-	-
		116	-	-	-
		117	-	-	-
		118	-	-	-
	Chimpanzé	119	-	+	+
		120	-	-	-
		121	-	+	+
		122	-	+	+
		123	-	-	+
		124	-	+	-
125		-	-	+	
126		-	+	+	
127		-	+	+	
128		-	+	+	
			13,3% (17/128)	29,7% (38/128)	17,2% (22/128)

*Indeterminado = Animais em coabitação nomeadamente Mico leão dourado (*Leontopithecus rosalia*) e Saguim tufos negros (*Callithrix penicillata*).

6.3. Anexo 3

Dados preliminares resultantes da pesquisa de homologia genética entre as sequências obtidas no decorrer do trabalho e as disponíveis na base de dados NCBI. Pesquisa realizada através da ferramenta BLASTn. É indicada a informação fornecida pelo programa como a descrição da sequência homóloga, *query cover*, *E-value*, % de identidade das sequências e número de acesso. Encontra-se indicado o número dos clones enviados para sequenciação, quando aplicável. As sequências homólogas às descritas de Tetraparvovírus estão destacadas e foram utilizadas posteriormente para a análise filogenética.

<i>Nome comum</i>	<i>Amostra</i>	<i>Sequência homóloga</i>	<i>Query cover</i>	<i>E-value</i>	<i>Identidade</i>	<i>Número de acesso</i>
Mico-leão-de-juba-dourada	10 Clone	<i>Roseburia intestinalis</i> XB6B4 draft genome	84%	2e-22	71%	FP929050.1
	10.1					
	10 Clone	<i>Prevotella ruminicola</i> 23, complete genome	87%	2e-41	80%	CP002006.1
	10.3					
Saimiri-da-bolívia	86 Clone	PREDICTED: <i>Arachis ipaensis</i> uncharacterized LOC107605842 (LOC107605842), mRNA	10%	0.28	100%	XM_016307766.1
	86.4					
Macaco-do-japão	36 Clone	<i>Torulaspora delbrueckii</i> partial 26S rRNA gene, strain ZIM 2414, isolate BGGO5-Y78	30%	5e-40	88%	HE660065.1
	36.1					
Siamango	75 Clone	<i>Lysinibacillus varians</i> strain GY32, complete genome	11%	3e-05	80%	CP006837.1
	75.1					
Lémure-de-cauda-anelada	97 Clone	PREDICTED: <i>Phoenix dactylifera</i> UDP-glucuronate 4-epimerase 4-like (LOC103700226), partial mRNA	14%	0.015	77%	XM_008782185.1
	97.1					
	97 Clone	<i>Slackia heliotrinireducens</i> DSM 20476, complete genome	10%	0.001	84%	CP001684.1
	97.3					

Todos os clones correspondem a plasmídeos transformados com o fragmento obtido pela amplificação por PCR do gene NS1

6.4. Anexo 4

Dados preliminares resultantes da pesquisa de homologia genética entre as sequências obtidas no decorrer do trabalho e as disponíveis na base de dados NCBI. Pesquisa realizada através da ferramenta BLASTn. É indicada a informação fornecida pelo programa como a descrição da sequência homóloga, *query cover*, *E-value*, % de identidade e número de acesso. Encontra-se indicado o número dos clones enviados para sequenciação, quando aplicável. As sequências homólogas às descritas de bocavírus estão destacadas e foram utilizadas posteriormente para a análise filogenética. O símbolo η junto ao nome da amostra representa que o fragmento sequenciado foi obtido pela amplificação por PCR do gene NS1 (*non- structural protein 1*), o símbolo ξ representa que o fragmento foi obtido pela amplificação por PCR do gene VP1 (*viral protein 1*).

<i>Nome comum</i>	<i>Amostra</i>	<i>Sequência homóloga</i>	<i>Query cover</i>	<i>E-value</i>	<i>Identidade</i>	<i>Número de acesso</i>
Saguim-de-face-branca	η 15 Clone 15.3	Kibdelosporangium sp. MJ126-NF4 complete genome	11%	0.63	79%	LN877229.1
Saguim-imperador	η 19 Clone 19.1	Olsenella uli DSM 7084, complete genome	91%	4e-110	82%	CP002106.1
	η 19 Clone 19.5	Acidaminococcus fermentans DSM 20731, complete genome	92%	5e-134	89%	CP001859.1
Macaco-fidalguinho	η 74 - Clone 74.1	Human bocavirus isolate HZ1102, complete genome	5%	0.55	100%	KP710203.1
	η 74 + Clone 74.1	Streptomyces venezuelae strain ATCC 15439, complete genome	24%	5e-09	76%	CP013129.1
Macaco-de-goeldi	η 88 Clone 88.4	Leptomonas pyrrhocoris hypothetical protein mRNA	6%	0.076	83%	XM_015806623.1
Babuíno-hamadrias	η 26 Clone 26.4	Arthrobacter sp. YC-RL1, complete genome	6%	0.047	94%	CP013297.1
	η 26 Clone 26.6	Solanum lycopersicum chromosome ch03, complete genome	20%	0.033	94%	HG975515.1

Macaco-do-japão	η 35 Clone 35.1	Hymenobacter sp. DG5B, complete genome	62%	5e-60	74%	CP013909.1
	η 35 Clone 35.5	Prevotella dentalis DSM 3688 chromosome 2, complete sequence	93%	2e-108	78%	CP003369.1
Macaco-do-japão	η 36 Clone 36.1	Prevotella dentalis DSM 3688 chromosome 2, complete sequence	84%	3e-46	77%	CP003369.1
Macaco-do-japão	η 40 Clone 40.3	Prevotella dentalis DSM 3688 chromosome 2, complete sequence	93%	2e-67	78%	CP003369.1
Macaco-cauda-de-leão	η 54 Clone 54.1	Intestinimonas butyriciproducens strain AF211, complete genome	82%	1e-73	76%	CP011307.1
	η 54 Clone 54.5	Intestinimonas butyriciproducens strain AF211, complete genome	83%	1e-73	75%	CP011307.1
	η 57 Clone 57.1	Myxococcus fulvus 124B02, complete genome	7%	0.055	90%	CP006003.1
Macaco-de-nariz-branco	η 14 Clone 14.3	Hymenobacter sp. DG5B, complete genome	62%	3e-57	73%	CP013909.1
Gibão-de-mãos-brancas	η 62 Clone 62.1	Uncultured bacterium extrachromosomal DNA RGF00009	81%	6e-66	78%	HG796776.1
Lémure-de-cauda-anelada	η 99 Clone 99.5	Intestinimonas butyriciproducens strain AF211, complete genome	83%	4e-136	85%	CP011307.1
Lémure-preto	η 101	Intestinimonas butyriciproducens strain AF211, complete genome	78%	5e-63	84%	CP011307.1
	η 102	Intestinimonas butyriciproducens strain AF211, complete genome	36%	2e-20	74%	CP011307.1
	η 103	Intestinimonas butyriciproducens strain AF211, complete genome	69%	2e-20	68%	CP011307.1
Lémure-preto-e-branco-de-colar	η 104	Homo sapiens chromosome 19, cosmid R28738, complete sequence	90%	5e-56	80%	AC004151.1
	η 105	Intestinimonas butyriciproducens	79%	2e-47	84%	CP011307.1

		strain AF211, complete genome				
	η 107	Streptomyces sp. S10(2016), complete genome	7%	0.16	89%	CP015098.1
Lémure- de-fronte- branca	η 111	Intestinimonas butyriciproducens strain AF211, complete genome	74%	3e-44	84%	CP011307.1
Lémure- vermelho	η 110 Clone 110.1	Intestinimonas butyriciproducens strain AF211, complete genome	83%	1e- 137	85%	CP011307.1
Chimpanzé	η 119	Bocavirus chimpanzee/PT- LM1861/CMR isolate PT-LM1861 non-structural protein (NS1) gene, partial cds	99%	0.0	97%	HQ113146.1
	η 121	Bocavirus chimpanzee/PT- LM1861/CMR isolate PT-LM1861 non-structural protein (NS1) gene, partial cds	99%	0.0	97%	HQ113146.1
	η 122	Bocavirus chimpanzee/PT- LM1861/CMR isolate PT-LM1861 non-structural protein (NS1) gene, partial cds	99%	0.0	96%	HQ113146.1
	η 124	Bocavirus chimpanzee/PT- LM1861/CMR isolate PT-LM1861 non-structural protein (NS1) gene, partial cds	99%	0.0	97%	HQ113146.1
	§ 124 Clone 124.1	Pimelobacter simplex strain VKM Ac-2033D, complete genome	6%	0.047	94%	CP009896.1
	§ 124 Clone 124.2	Pennisetum glaucum AFLP fragment RQVTKKA1-3	4%	1e-07	98%	FN552471.1
	§ 124 Clone 124.3	Pseudomonas aeruginosa strain N15-01092, complete sequence	8%	4e-07	79%	CP012901.1
	η 126	Bocavirus chimpanzee/PT- LM1861/CMR isolate PT-LM1861	100%	0.0	97%	HQ113146.1

	non-structural protein (NS1) gene, partial cds				
§ 126 Clone 126.1	Zebrafish DNA sequence from clone CH73-5K23 in linkage group 18, complete sequence	4%	0.11	83%	CU570794.4
§ 126 Clone 126.2	Zebrafish DNA sequence from clone CH73-5K23 in linkage group 18, complete sequence	4%	0.11	83%	CU570794.4
η 127	Bocavirus chimpanzee/PT-LM1861/CMR isolate PT-LM1861 non-structural protein (NS1) gene, partial cds	100%	0.0	97%	HQ113146.1
η 128	Bocavirus chimpanzee/PT-LM1861/CMR isolate PT-LM1861 non-structural protein (NS1) gene, partial cds	100%	0.0	97%	HQ113146.1

6.5. Anexo 5

Dados preliminares resultantes da pesquisa de homologia genética entre as sequências obtidas no decorrer do trabalho e as disponíveis na base de dados NCBI. Pesquisa realizada através da ferramenta BLASTn. É indicada a informação fornecida pelo programa como a descrição da sequência, *query cover*, *E-value*, identidade e número de acesso. Encontra-se indicado o número dos clones enviados para sequenciação, quando aplicável. As sequências homólogas às descritas de protoparvovírus estão destacadas e foram utilizadas posteriormente para a análise filogenética. O símbolo η junto ao nome da amostra representa que o fragmento sequenciado foi obtido pela amplificação por PCR do gene NS (*non- structural protein*), o símbolo ξ representa que o fragmento foi obtido pela amplificação por PCR do gene VP (*viral protein*).

<i>Nome comum</i>	<i>Amostra</i>	<i>Sequência homóloga</i>	<i>Query cover</i>	<i>E-value</i>	<i>Identidade</i>	<i>Número de acesso</i>
Mico-leão-de-jubadourada	η 10 Clone 10.2	Faecalibacterium prausnitzii L2/6 draft genome	89 %	2e-70	93%	FP929045.1
Macaco-do-japão	η 35	WUHARV Parvovirus 1 nonstructural protein 1 and VP-1 genes, complete cds	99%	2e-166	91%	JX627576.1
	ξ 35 - Clone 35.1	Bacteroides cellulosilyticus strain WH2, complete genome	27%	3e-27	71%	CP012801.1
	ξ 35 - Clone 35.2	Bacteroides cellulosilyticus strain WH2, complete genome	30%	3e-27	71%	CP012801.1
	ξ 35 + Clone 35.1	Uncultured eukaryote clone N107T_255 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	5%	6e-05	87%	GU941245.1
	ξ 35 + Clone 35.2	Bacteroides cellulosilyticus strain WH2, complete genome	30%	3e-27	71%	CP012801.1
Macaco-cauda-de-leão	η 52	WUHARV Parvovirus 1 nonstructural protein 1 and VP-1 genes, complete cds	99%	2e-151	89%	JX627576.1
	η 54	WUHARV Parvovirus 1 nonstructural protein	99%	3e-180	94%	JX627576.1

		1 and VP-1 genes, complete cds				
	§ 54 Clone 54.1	Oscillibacter valericigenes Sjm18-20 DNA, complete genome	10%	5e-25	85%	AP012044.1
	§ 54 Clone 54.4	Oscillibacter valericigenes Sjm18-20 DNA, complete genome	12%	4e-25	85%	AP012044.1
	η 55	WUHARV Parvovirus 1 nonstructural protein 1 and VP-1 genes, complete cds	98%	2e- 147	89%	JX627576.1
	§ 55 Clone 55.1	Uncultured bacterium clone S07_TR_73 genomic sequence	42%	2e-15	69%	KJ693104.1
	§ 55 Clone 55.2	Caulobacter sp. K31, complete genome	23%	9e-15	70%	CP000927.1
	η 57	WUHARV Parvovirus 1 nonstructural protein 1 and VP-1 genes, complete cds	100%	0.0	95%	JX627576.1
	η 58	WUHARV Parvovirus 1 nonstructural protein 1 and VP-1 genes, complete cds	99%	0.0	95%	JX627576.1
	§ 58 Clone 58.2	Uncultured gamma proteobacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: ARB26252BF3	8%	1e-13	85%	LC018931.1
	§ 58 Clone 58.3	Bufavirus-2 strain BF.39 NS1, putative VP1, hypothetical protein, and VP2 genes, complete cds	2%	0.093	100%	JX027297.1
Macaco- de-nariz- branco	η 59	Mfuwe bufavirus gene for NS1, partial cds, strain: ZM09-91	98%	1e- 158	90%	LC011425.1
	η 60	Mfuwe bufavirus gene for NS1, partial cds, strain: ZM09-91	98%	6e- 157	89%	LC011425.1
Macaco- de-brazza	η 8 Clone 8.1	Corynebacterium humireducens NBRC 106098 = DSM 45392, complete genome	84%	6e-96	80%	CP005286.1
Macaco- diana	η 56 Clone 56.2	Porcine bufavirus strain 61 NS1 and VP1 genes, partial cds; hypothetical protein gene, complete cds; and VP2 gene, partial cds	98%	2e- 145	85%	KU867071.1
	η 56 Clone 56.3	Porcine bufavirus strain 61 NS1 and VP1 genes, partial cds; hypothetical protein gene, complete cds; and VP2 gene, partial cds	99%	2e- 121	85%	KU867071.1

Macaco-testiverde	η 5 <i>Clone 5.1</i>	WUHARV Parvovirus 1 nonstructural protein 1 and VP-1 genes, complete cds	5%	0.004	100%	JX627576.1
Gibão-de-mãos-brancas	η 61	Mfuwe bufavirus gene for NS1, partial cds, strain: ZM09-91	98%	2e-87	81%	LC011425.1
	η 62	Porcine bufavirus strain 61 NS1 and VP1 genes, partial cds; hypothetical protein gene, complete cds; and VP2 gene, partial cds	97%	1e-104	83%	KU867071.1
Chimpanzé	η 119	Bufavirus-2 strain BF.39 NS1, putative VP1, hypothetical protein, and VP2 genes, complete cds	99%	0.0	98%	JX027297.1
	η 121	Bufavirus-2 strain BF.39 NS1, putative VP1, hypothetical protein, and VP2 genes, complete cds	99%	0.0	98%	JX027297.1
	η 122	Bufavirus-2 strain BF.39 NS1, putative VP1, hypothetical protein, and VP2 genes, complete cds	100%	0.0	98%	JX027297.1
	§ 122 <i>Clone 122.1</i>	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type N2 (PTPRN2), RefSeqGene on chromosome 7	97%	0.0	97%	NG_029966.1
	§ 122 <i>Clone 122.2</i>	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type N2 (PTPRN2), RefSeqGene on chromosome 7	98%	0.0	99%	NG_029966.1
	η 123	Bufavirus-3 genes for NS1, VP1, VP2, complete cds, strain: AHP-692	99%	0.0	99%	AB982221.1
	η 125	Bufavirus-2 strain BF.39 NS1, putative VP1, hypothetical protein, and VP2 genes, complete cds	99%	0.0	98%	JX027297.1
	η 126	Bufavirus-2 strain BF.39 NS1, putative VP1, hypothetical protein, and VP2 genes, complete cds	99%	0.0	98%	JX027297.1
	η 127 <i>Clone 127.4</i>	Bufavirus-2 strain BF.39 NS1, putative VP1, hypothetical protein, and VP2 genes,	100%	0.0	98%	JX027297.1

	complete cds				
η 128	Bufavirus-2 strain BF.39 NS1, putative VP1, hypothetical protein, and VP2 genes, complete cds	99%	0.0	98%	JX027297.1

6.6. Anexo 6

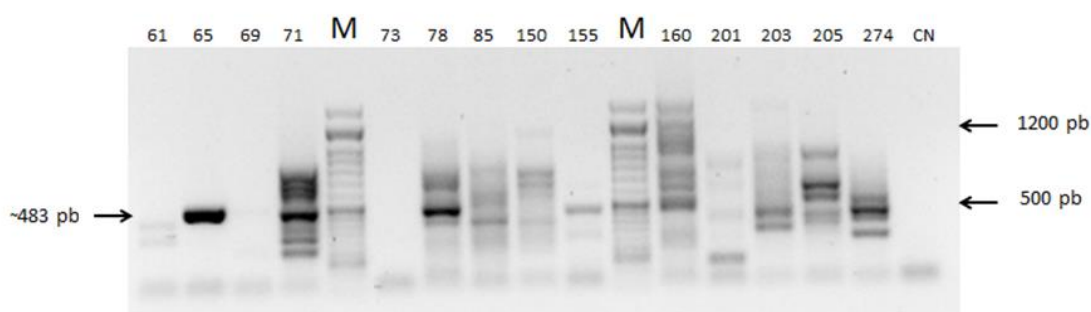
Descrição das amostras complementares estudadas.

	Nome comum	Local	Número de amostras
Morcegos	Morcegos	Alentejo	14
Pequenos mamíferos	Musaranho	Jardim Zoológico	1
	Roedor	de Lisboa	3

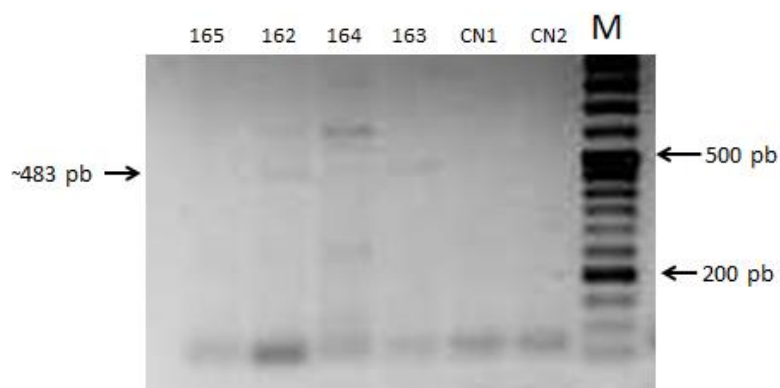
As amostras de fezes de morcego foram colhidas de uma gruta no Alentejo em Abril de 2016. As amostras foram colhidas do solo da gruta não sendo possível identificar a espécie de origem do morcego. As amostras fecais de pequenos mamíferos foram retiradas directamente do aparelho digestivo dos animais capturados em armadilhas no Jardim Zoológico de Lisboa em Julho de 2016.

O DNA foi extraído de 200µl de sobrenadante da amostra fecal usando o *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche, Alemanha) segundo as instruções do fabricante para o protocolo de isolamento de ácidos nucleicos a partir de sangue total de mamífero, camada leucoplaquetária ou culturas celulares como descrito em 2.2.

O protocolo para a amplificação de DNA de BuV em amostras fecais de morcegos foi semelhante ao realizado para a amplificação de DNA em amostras fecais de primatas não humanos como descrito em 2.3., com a excepção da realização de *hemi-nested* PCR com recurso aos *primers* BUVF3 e BUVR1 para a primeira reacção e os *primers* BUVF3 e BUVR2 para a segunda reacção (*primers* descritos na tabela 1). Para a amplificação de DNA de BuV em amostras fecais de pequenos mamíferos o protocolo foi semelhante ao descrito em 2.3., com a excepção de que para ambas as reacções de *nested* PCR foram realizados 45 ciclos de amplificação. Para ambos os tipos de amostras fecais, de morcegos e pequenos mamíferos, a amplificação na segunda reacção resultou num fragmento esperado com aproximadamente 483pb.



Detecção de BuV em amostras fecais de morcegos. Amplificação por *hemi-nested* PCR de parte do gene NS1. São apresentados os produtos da segunda reacção de PCR após separação em gel de 1,5% de agarose e indicada a dimensão do produto esperado (~483 pb). M- Marcadores de tamanho molecular *NZYDNA Ladder VI* (NZYTech, Portugal); pb- pares de bases; CN- Controlo negativo da segunda reacção.



Detecção de BuV em amostras fecais de pequenos mamíferos. Amplificação por *nested* PCR de parte do gene NS1. São apresentados os resultados da segunda reacção de PCR após separação em gel de 1,5% de agarose e indicada a dimensão do produto esperado (~483 pb). M- Marcadores de tamanho molecular *NZYDNA Ladder VI* (NZYTech, Portugal); pb- pares de bases; CN1- Controlo negativo da primeira reacção; CN2- Controlo negativo da segunda reacção.

Foram encontrados amplicões com o tamanho esperado em 7 das 14 amostras analisadas provenientes de morcegos e em 2 das 4 amostras de pequenos mamíferos. Os

9 amplicões foram purificados a partir do gel como descrito no ponto 2.5., e sequenciados directamente.

Foi feita a análise e edição de todos os cromatogramas e sequências nucleotídicas e estas comparadas com outras sequências nucleotídicas disponíveis na base de dados NCBI. Quatro sequências nucleotídicas apresentaram similaridades com o genoma de protoparvovírus, sendo duas destas provenientes das amostras de morcegos (PTM65; PTM71) e duas provenientes das amostras de pequenos mamíferos (ZLX162; ZLX163).

Os resultados das restantes 5 sequências nucleotídicas apresentavam cromatogramas com muitas zonas ilegíveis e de sobreposição de picos, por isso 3 fragmentos foram sujeitos a clonagem molecular no vector *pGEM[®]-T Easy* (Promega, EUA) na tentativa de obter uma sequência nucleotídica fiável. Foi extraído DNA plasmídico de 6 colónias bacterianas transformantes por cada amostra e após a digestão enzimática foi confirmado o tamanho do vector de 3015 pb e foi examinado o tamanho do inserto libertado de 483 pb. Todos os clones cujo tamanho do inserto libertado tinha o tamanho esperado foram sequenciados. Como anteriormente, foi feita a análise e edição das sequências nucleotídicas foram comparadas com outras sequências nucleotídicas disponíveis na base de dados NCBI, nenhuma das sequências nucleotídicas apresentava similaridades com protoparvovírus descritos.

Detectou-se protoparvovírus em duas amostras provenientes de morcegos e duas amostras provenientes de pequenos mamíferos, um roedor e um musaranho, os dados preliminares resultantes da pesquisa de homologia genética entre todas as sequências e as disponíveis na base de dados NCBI encontra-se descrito abaixo. A pesquisa foi realizada através da ferramenta BLASTn. É indicada a informação fornecida pelo programa como a descrição da sequência homóloga, *query cover*, *E-value*, identidade e número de acesso. Encontra-se indicado o número dos clones enviados para sequenciação, quando aplicável. As sequências homólogas às descritas de Protoparvovírus estão destacadas e foram utilizadas posteriormente para a análise filogenética. Todos os fragmentos sequenciados foram obtidos pela amplificação por PCR do gene NS.

<i>Nome comum</i>	<i>Amostra</i>	<i>Sequência homóloga</i>	<i>Query cover</i>	<i>E-value</i>	<i>Identidade</i>	<i>Número de acesso</i>
Morcego	65	Myotis ricketti parvovirus isolate Bat Mr-PV/Shaanxi2011, partial genome	99%	0.0	94%	KKC154060.1
	71	Myotis ricketti parvovirus isolate Bat Mr-PV/Shaanxi2011, partial genome	99%	0.0	93%	KKC154060.1
	78 Clone 78.1	Não foi possível obter uma sequência de qualidade				
	78 Clone 78.3	Não foi possível obter uma sequência de qualidade				
	78 Clone 78.4	Muricauda ruestringensis DSM 13258, complete genome	51%	8e-06	65%	CP002999.1
	78 Clone 78.5	Muricauda ruestringensis DSM 13258, complete genome	53%	8e-06	65%	CP002999.1
	78 Clone 78.6	Não foi possível obter uma sequência de qualidade				
	155 Clone 155.1	Labrenzia sp. CP4, complete genome	91%	2e-75	76%	CP011927.1
	155 Clone 155.2	Methyloceanibacter caenitepidi DNA, complete genome, strain: Gela4	93%	4e-78	76%	AP014648.1
	155 Clone 155.3	Labrenzia sp. CP4, complete genome	91%	1e-73	76%	CP011927.1
	155 Clone 155.4	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025, complete genome	95%	2e-76	76%	CP000661.1
	155 Clone 155.5	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025, complete genome	95%	2e-76	76%	CP000661.1
	155 Clone 155.6	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025, complete genome	95%	2e-76	76%	CP000661.1
	160 Clone 160.2	Chromohalobacter salexigens DSM 3043, complete genome	93%	9e-126	82%	CP000285.1
	160 Clone 160.3	Rhodopseudomonas palustris DX-1, complete genome	90%	8e-69	75%	CP002418.1
	160 Clone 160.4	Chromohalobacter salexigens DSM 3043, complete genome	95%	8e-126	81%	CP000285.1

	160 Clone 160.5	Chromohalobacter salexigens DSM 3043, complete genome	95%	2e-127	81%	CP000285.1
	203	Não foi possível obter sequência de qualidade				
	274	Não foi possível obter sequência de qualidade				
Musaranho	162	Bufavirus-2 strain BF.39 NS1, putative VP1, hypothetical protein, and VP2 genes, complete cds	100%	0.0	97%	JX027297.1
Rato	163	Bufavirus-2 strain BF.39 NS1, putative VP1, hypothetical protein, and VP2 genes, complete cd	99%	0.0	98%	JX027297.1

6.7. Anexo 7

Lista de sequências usadas como referência para a construção da árvore filogenética relativa ao gene NS1 de bocavírus

HBoV1	JX434069 EU262978 DQ000496	NC007455 KP710209 EU984232	JN128953 JN794565 JQ923422
HBoV2	FJ948860 EU082213 FJ973558 FJ973559	NC012042 GU048664 NC028101	FJ973560 FJ170278 GU048662
HBoV3	FJ948861 FJ973563	GQ867667 FJ973562	NC012564
HBoV4	NC012729	FJ973561	
Bocavirus de chimpanzé	KT223502	HQ113148	HQ113146
Bocavirus gorilla	NC014358	HQ113147	
Canine Minute Virus	NC004442		
Bovine parvovirus (BPV)	NC001540		

6.8. Anexo 8

Lista de sequências usadas como referência para a construção da árvore filogenética relativa ao gene NS1 de protoparvovírus

Bufavírus humano 1	JX027296	KM580347	KM580351
Bufavírus humano 2	JX027297		
Bufavírus humano 3	AB982220	KM580348	NC024888 AB982221
Mpulung bufavírus	LC011427	NC026815	AB937988
Solwezi bufavírus	LC0111437	LC0111431	LC0111441
Mfuwe bufavírus	LC011424		
Livingstone bufavírus	LC011423		
Parvovírus WUHARV	JX627576		
Parvovírus morcego	KC154060	KR078344	KC154061
Parvovírus raposa voadora	LC085666	NC029797	LC085667
Parvovírus suíno	NC_001718	KU867071	KT965075
<i>Tusavirus 1</i>	KJ495710		
Parvovírus rato	AF036710	NC_028650	
Parvovírus murganho	DQ196319	FJ441297	
MVM	NC001510		
Vírus da doença aleutiana das marmotas	NC_001662		